

Producción de un antisuero específico contra la cepa A/Johannesburg/33/94 (H3N2), y su utilidad en la caracterización de aislamientos de virus de influenza en ratas Wistar

Suset Oropesa, Francisco Calvi, Bárbara Hernández, Jorge Cantillo, Omayda Pérez, Irais Atencio, Angel Goyenechea

Instituto de Medicina Tropical Pedro Kourí (IPK). Novia del Mediodía. Km. 6 ½. La Lisa. Ciudad de La Habana. Cuba. Laboratorio Nacional de Influenza.

E-mail: s.oro@ipk.sld.cu, soro@infomed.sld.cu

Se obtuvo un antisuero policlonal con alto título, alta especificidad y sensibilidad, contra la hemaglutinina de la cepa de influenza A/Johannesburg/33/94 que pertenece al subtipo A (H3N2). Se describe el proceso de obtención del antígeno o inmunógeno, el esquema de inmunización y su aplicación a las ratas Wistar como modelo animal; y se validó mediante la técnica de inhibición de la hemaglutinación (IH). El antisuero obtenido fue tratado con enzima destructora de receptores de producción nacional (EDR/IPK) para la eliminación de inhibidores inespecíficos de la IH. La validación se realizó frente a un panel que incluyó 9 cepas de referencia de influenza de los subtipos A(H3N2), A(H1N1) y el tipo B. No se detectaron reacciones inespecíficas frente a cepas A(H1N1) y del tipo B. Se determinó el tipo y subtipo de aislamientos autóctonos con resultados satisfactorios.

Palabras clave: Virus influenza, antisueros policlonales, caracterización antigénica, inhibición de la hemaglutinación.

Introducción

Los virus de la influenza sufren continuos cambios en su estructura antigénica, estas transformaciones son más frecuentes en la molécula de la hemaglutinina (HA), lo que da lugar a tipos y subtipos diferentes (dentro del tipo A básicamente), mecanismo por el cual surgen nuevas cepas virales contra las cuales la población carece de una adecuada respuesta inmune (1, 2, 3).

Para evaluar estos cambios antigénicos se utiliza fundamentalmente la inhibición de la hemaglutinación (IH) (4), que permite medir la respuesta de los aislamientos virales frente a sueros hiperinmunes específicos y sensibles contra epítomos de la HA de cepas de anterior y reciente circulación.

Cuando los aislamientos se enfrentan a un panel suficientemente amplio de sueros esta técnica permite establecer similitudes antigénicas más estrechas en la caracterización (5).

La producción de estos sueros se realizó en cabras, conejos, curieles, hámsters, pollos y hurones, siendo estos últimos los más utilizados en los centros de referencia debido a su gran sensibilidad (6, 7, 8).

Fuera de estas prácticas, existen referencias de otros autores que recomiendan el empleo de ratas, sin especificar la línea genética para estas producciones, estos animales permiten obtener sueros con un mínimo de inhibidores inespecíficos, por no ser hospederos naturales del virus de la gripe (9,10).

En este trabajo se elaboró y comprobó un esquema de inoculación para la obtención de sueros hiperinmunes policlonales, utilizando como medio biológico las ratas Wistar, lo que garantiza, además, un adecuado nivel de caracterización antigénica de los aislamientos de virus de influenza en cada temporada.

Materiales y Métodos

Animales: Se utilizaron 6 ratas Wistar (machos, de 350 grs. de peso y aproximadamente 85 días de edad, no consanguíneas, producidas y /o mantenidas en barrera, y 4 ratas como control con iguales características. También se utilizaron embriones de pollo de la raza White Leghorn de 9 días de incubación para la producción del antígeno.

Los animales utilizados en la investigación cumplían con las especificidades de calidad requeridas para este tipo de trabajo (11). Para garantizar la aplicación de las medidas de bioseguridad, la multiplicación y purificación de la cepa utilizada como antígeno, así como las inoculaciones y toma de muestra a los animales se realizaron en un gabinete de seguridad clase 2(BSL2) (12).

Virus: Se utilizó la cepa de influenza A/Johannesburg/33/94(H3N2), procedente del Centro para el Control y Prevención de Enfermedades de la Organización Mundial de la Salud de Atlanta, Georgia, EEUU (CDC).

La cepa fue inoculada en la cavidad amniótica de los embriones de pollo de 9 días para comprobar su viabilidad y su posterior multiplicación. Se determinó el título infectivo de la cepa y se calculó la DI_{50} para el embrión de pollo, posteriormente se produjo el antígeno, según las normas establecidas (13).

Con la dosis infectiva media (DI_{50}), se inocularon 30 embriones y se colectó el líquido corioalantoideo, que fue clarificado a 10,000 rpm durante 30 min para eliminar los restos de membranas y hematíes. El sobrenadante se decantó y fue ultracentrifugado a 40 000 rpm durante 2 h a 4 °C. Se resuspendió el pellet en 5 mL de PBS, conservándose a -70 °C hasta su uso.

Se comprobó la especificidad del antígeno, frente a su suero homólogo mediante la técnica de IH y se verificó la esterilidad del mismo.

La concentración proteica del antígeno se determinó por el método de Lowry (14).

Aislamientos de virus de influenza. Fueron incluidos para su caracterización antigénica 5 aislamientos (15/97, 16/97, 18/97, 19/97 y 21/97) procedentes de individuos con infección respiratoria aguda, que pertenecieron a la temporada de influenza 1996-1997.

Esquema de inmunización

Se realizó una extracción de sangre a 6 ratas Wistar por punción intracardiaca antes de comenzar el esquema de inoculación, para determinar por la técnica de IH si tenían o no anticuerpos contra la cepa A/Johannesburg/33/94(H3N2) que sería utilizada como inmunógeno. También se determinaron los títulos de anticuerpos frente a 9 antígenos que incluían cepas de influenza del subtipo A(H1N1), A(H3N2) y del tipo B.

Previo a la inmunización las ratas fueron anestesiadas. Para ello se utilizaron 6 ratas identificadas y 4 como controles, que fueron inoculadas con PBS siguiendo el mismo esquema. Las vías de inoculación fueron la intraperitoneal (0,5 mL) y la intranasal (10 µl), aplicándose virus vivo en una concentración de 0,015 µg/µl, mezclado con adyuvante completo de Freund (Sigma Immunochemicals) a partes iguales en la primera inoculación. A partir de la segunda dosis de antígeno, se utilizó adyuvante incompleto de Freund (Sigma Immunochemicals) y se realizaron los días 1, 12, 20 y 28. A los 33 días se realizó una extracción de sangre a las ratas y a los controles por punción intracardiaca (IC), para medir el nivel de anticuerpos desarrollado en estos animales por IH y constatar la ausencia de anticuerpos en las ratas controles. Se inmunizó con una dosis de refuerzo a los 34 días, y una semana después se realizó el sangramiento total por incisión de las arterias y venas femorales.

Prueba serológica

Los sueros obtenidos fueron analizados por IH, después de ser tratados con calor (56 °C por 30 min) para eliminar los inhibidores termolábiles e inactivar la acción de la EDR/IPK, recomendada para eliminar los inhibidores inespecíficos termoestables de la hemaglutinación.

El desarrollo de los anticuerpos por las ratas Wistar se determinó utilizando la técnica de IH por micrométodo (4). La prueba de IH se realizó con un panel que incluía antígenos de 9 cepas de referencia de influenza y sus antisueros homólogos: A/Taiwan/1/86 (H1N1), A/Singapur/6/86(H1N1), A/Texas/36/91(H1N1) y el antisuero A/H1N1(CDC); dentro del subtipo A(H3N2) las cepas A/Shangdong/09/93, A/Johannesburg/33/94, la A/Wuhan/359/95, las cepas B/Beijing/184/93 y B/Guangdong/5/94. Se incluyeron los 6 sueros de las ratas inoculadas y de los controles, lo que permitió

titularlos y comprobar su especificidad. Se incluyeron en el panel 5 aislamientos de la temporada ya descritos.

Interpretación de los resultados

El título de cada suero fue el valor recíproco de la última dilución donde se observe inhibición total de la hemaglutinación, que se manifestó como un botón bien definido que corrió por el fondo de los pocillos como una lágrima al inclinar la placa.

Resultados

La inmunización con virus de influenza induce la producción de anticuerpos neutralizantes específicos, en este caso anticuerpos antihemaglutininas a la cepa A/Johannesburg/33/94 (H3N2), utilizada como inmunógeno. Su titulación en embriones de pollo estuvo relacionada con la obtención de la DI_{50} , que resultó ser la dilución de 10^{-4} .

A partir de su inoculación en huevos embrionados, se obtuvo un antígeno con un título de 1:256 por IH, en cantidad suficiente para ser ultracentrifugado. Posteriormente se midió la concentración proteica del pellet obtenido por el método de Lowry (30 mg/mL), que fue diluido hasta obtener una concentración de 0,15µg/µL de proteínas totales del virus, satisfactoria como inmunógeno para la producción del antisuero.

Los tratamientos utilizados para eliminar los inhibidores inespecíficos arrojaron buenos resultados.

Se comprobó, previo a la inmunización, que los animales empleados no tenían anticuerpos antihemaglutinina contra los 9 antígenos de virus de influenza pertenecientes a los subtipos A (H3N2), A (H1N1) y el tipo B incluidas en la validación del antisuero.

Los títulos de anticuerpos obtenidos fluctuaron entre 1:160 y 1: 640. En los sueros correspondientes a las ratas controles no se detectaron anticuerpos contra la HA.

Como resultado del sangramiento total se obtuvo un volumen final de 14,5 mL del suero hiperinmune policlonal contra la cepa A/Johannesburg/33/94(H3N2) y 10 mL de suero control o negativo.

Las medidas de bioseguridad aplicadas durante el experimento fueron efectivas.

En la Tabla 1 se presentan los resultados de la validación del antisuero obtenido. Se obtuvieron títulos de anticuerpos antihemaglutinantes que oscilaron entre 1:160 y 1:640 por IH. Frente a la cepa A/Johannesburg/33/94(H3N2), utilizada como inmunógeno para la producción del antisuero, los títulos de anticuerpo fluctuaron entre 1:320 y 1:640. Con las otras cepas pertenecientes también al subtipo H3 del virus influenza se detectaron niveles de anticuerpos entre 1:160 y 1:640. No se observaron reacciones inespecíficas frente a las cepas del subtipo A(H1N1) utilizadas la A/Taiwan/1/86 (H1N1), la A/Singapur/6/86(H1N1) y la A/Texas/36/91(H1N1). Idénticos resultados se obtuvieron con las cepas del tipo B (B/Beijing/184/93 y B/Guangdong/5/94).

Tabla 1. Validación del antisuero A/Johannesburg/ 33/94 (H3N2) tratado con EDR/IPK frente a cepas de referencia y aislamientos de influenza utilizando la técnica de inhibición de la hemaglutinación

SUEROS	CEPAS DE REFERENCIA (ANTÍGENOS)*														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	15/97	16/97	18/97	19/97	21/97	
1. A/Taiwan/1/86 (H1N1)	640	320	320	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	
2. A/Singapur/6/96 (H1N1)	320	640	160	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	
3. A/Texas/36/91 (H1N1)	320	320	320	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	
4. A (H1N1)	640	160	80	320	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	
5. A/Shangdong/09/93	<	<	<	<	640	320	320	<	<	640	40	20	40	640	
6. A/Johannesburg/ 33/94 (H3N2)	<	<	<	<	320	640	640	<	<	1280	40	20	40	320	
7.A/Wuhan/359/95 (H3N2)	<	<	<	<	320	640	640	<	<	1280	40	20	80	640	
8. B/Beijing/184/93	<	<	<	<	<	<	<	640	160	<	<	<	<	<	
9. B/Guangdong/5/94	<	<	<	<	<	<	<	<	640	<	<	<	<	<	
Suero Control Negativo (CDC)	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	
Suero Control Negativo (Cuba)	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	<	
Antisuero rata no.1	<	<	<	<	160	640	320	<	<	<	<	<	<	<	
Antisuero rata no.2	<	<	<	<	320	320	320	<	<	1280	40	20	40	320	
Antisuero rata no.3	<	<	<	<	320	640	640	<	<	1280	20	20	80	320	
Antisuero rata no.4	<	<	<	<	640	640	640	<	<	1280	40	20	40	640	
Antisuero rata no.5	<	<	<	<	160	640	320	<	<	640	20	20	40	160	
Antisuero rata no.6	<	<	<	<	320	640	320	<	<	1280	20	20	40	320	

* Los antígenos numerados del 1 al 9 se corresponden con su suero homólogo.

<: Título menor de 1:10.

Como puede observarse en la Tabla, no se detectaron anticuerpos frente a ninguno de los antígenos incluidos en el estudio con los sueros control negativo. Se corroboró una correspondencia antigénica entre los aislamientos caracterizados antigénicamente y las cepas pertenecientes al subtipo A(H3N2), especialmente con la A/Johannesburg/33/94 (H3N2) y la A/Wuhan/359/95 (H3N2). No se detectaron anticuerpos al enfrentar estos aislamientos con sueros pertenecientes al subtipo A (H1N1) ni al tipo B del virus de influenza.

Se observó frente a la cepa homóloga A/Johannesburg/ 33/94 (H3N2), los mayores títulos obtenidos en los antisueros producidos.

Discusión

Los factores más importantes en la producción de un antisuero de alta especificidad y pureza son la calidad y cantidad del inmunógeno, el modelo animal y su respuesta inmune, el esquema de inmunización, la purificación y su titulación (8, 15,16).

Los ratones no son infectados naturalmente por el virus de influenza, condición por la que generalmente se utilizan para realizar las pruebas de inocuidad de este virus y producción de sueros, siendo su respuesta primaria de mayor especificidad, uniformidad y duración que las obtenidas en otros modelos animales (17,18,19), cualidades que le proporcionan a las ratas Wistar resultar idóneas como modelo

biológico para la producción de sueros hiperinmunes contra la influenza, y además debido a su tamaño permiten obtener mayor cantidad de suero.

Como referencias anteriores, se reporta la utilización de ratas blancas, sin especificar la línea, con estos propósitos, empleando como inmunógeno proteínas totales purificadas a partir de estos virus o de uno de los constituyentes proteicos, generalmente la hemaglutinina (15, 20).

La inoculación del virus por vía intranasal conjuntamente a la parenteral se recomienda para la obtención de mejores resultados (21). Diferentes investigadores señalan otras vías de inoculación y a su vez recomiendan que las inmunizaciones pueden ser en un sitio único o en varios simultáneamente, para obtener respuesta inmune contra alguna de las proteínas virales específicamente (15, 21).

En nuestra investigación se logró una buena respuesta humoral con la aplicación de un antígeno de virus vivo con el esquema, concentración de proteínas y vías utilizadas.

La respuesta de anticuerpos en las ratas se evidenció a los 33 días, estando los títulos obtenidos por encima de los valores establecidos para la técnica de IH, por lo que se estimó que los sueros utilizados en las caracterizaciones antigénicas no deben tener un valor inferior a 1:160 (8).

Se recomienda el empleo de virus vivo para la inoculación de estos animales, pues se obtienen mejores resultados en la respuesta de anticuerpos (22, 23), que con la administración de virus inactivado.

El método recomendado actualmente por el Comité de Expertos de la OMS para el subtipaje de los virus de influenza es el uso de antisueros específicos preparados en diversos animales, con un mínimo de reacciones inespecíficas, determinadas por la técnica de IH, práctica de aplicación diaria en el diagnóstico de los virus de influenza (5,7).

Uno de los inconvenientes en el uso de la técnica de IH es la presencia de inhibidores inespecíficos en los sueros, los que se eliminan aplicando diversos tratamientos antes de comenzar a realizar la prueba. El tratamiento con EDR está reconocido como el más efectivo (7,8), pero presenta el inconveniente de ser más costoso.

Quedó demostrado por los resultados obtenidos que el suero hiperinmune producido en ratas Wistar, contiene una mínima cantidad de inhibidores inespecíficos, fáciles de eliminar utilizando el tratamiento la EDR. Estos sueros se recomiendan además, como los más convenientes para ser utilizados en la técnica de IH con el objetivo de tipificar los virus de influenza (6). No sucede así con los sueros obtenidos postinfección en otras especies animales como curieles, conejos, hámsters, los que presentan la desventaja de contener grandes cantidades de inhibidores inespecíficos que persisten aún después de ser tratados (13,17).

Los altos títulos evidencian gran identidad del antisuero obtenido en la totalidad de las ratas inoculadas, al enfrentar los mismos con la cepa homóloga A/Johannesburg/33/94 (H3N2) y con cepas relacionadas del mismo subtipo (A/H3N2) (Tabla 1), similares a los obtenidos con los sueros de referencia utilizados para comparar nuestros resultados (8).

Por el contrario frente a las cepas del subtipo A (H1N1) y con las cepas del tipo B no se detectó la presencia de anticuerpos.

Este antisuero policlonal fue validado también en la identificación de 5 aislamientos obtenidos en 1997, lo que demostró gran especificidad y sensibilidad en la caracterización de cepas del subtipo A (H3N2).

La cepa 15/97 reaccionó con títulos antiHA de 1:1280, y la 21/97 hasta 6/97, de 1:640 lo que demuestra la gran similitud antigénica de esta cepa autóctona con la cepa A/Johannesburg/33/94 (H3N2). Desde 1996 en países como Inglaterra, Sudáfrica, Argentina, Brasil, Chile, EEUU, Canadá y otros, se sigue detectando la circulación de esta cepa (24, 25).

Con los aislamientos 16/97, 18/97 y 19/97 los títulos resultaron bajos (entre 1:20 y 1:80), por lo que se clasificó dentro del subtipo AH3N2, pero con diferencias antigénicas con respecto a la cepa A/Johannesburg/33/94 (H3N2), reportándose en el mundo aislamientos de virus de influenza antigénicamente heterogéneos o diferentes a esta cepa de referencia (26,27).

El subtipo AH3N2 es el principal agente causal de casos esporádicos y brotes epidémicos de influenza en el mundo, especialmente entre

los grupos de riesgo, además de los efectos económicos y sociales negativos con alta incidencia de esta enfermedad por lo que la producción de sueros hiperinmunes específicos contra la HA de cepas de referencia o autóctonas de los virus influenza, que permitan su caracterización antigénica en tipo y subtipo, refuerza la capacidad de lucha contra esta enfermedad (9, 10, 28).

Conclusión

La rata Wistar resultó ser un modelo animal idóneo para la producción de un antisuero policlonal, con alto título, gran especificidad y sensibilidad contra la HA del virus influenza, demostrada con la caracterización de cepas de referencia y autóctonas mediante la IH; conjuntamente con el esquema de inmunización y el tratamiento utilizado para la eliminación de los inhibidores inespecíficos.

Referencias

1. Fouchier R, Munster V, Wallensten A, Bestebroer T, Herfst S, Smith D. Characterization of a Novel Influenza A Virus Hemagglutinin Subtype (H16) Obtained from Black-Headed Gulls. *Journal of Virology*. 2005;79(5):2814-22.
2. Holmes EC, Ghedin E, Miller N. Whole-genome analysis of human influenza A virus reveals multiple persistent lineages and reassortment among recent H3N2 viruses. *PLoS Biol*. 2005;3(9): 300-310.
3. Kamps BS, Hoffman C, Preiser W, editores. *Influenza Report*. Flying Publisher; 2006 [citado el 3 de junio del 2006]. Disponible en: <http://www.influenzareport.com>.
4. Palmer D, Dowdle W, Coleman M, Shild G. Advanced laboratory techniques for influenza diagnosis. *Immunology series N0 6. Part. 2: procedural guide US Department of Health Educat. And Public Health Service*. 1975:25-62.
5. Swenson PD. Hemagglutination inhibition test for the identification of influenza viruses. En: Iceberg HD, editor. *Clinical Micro-biology Procedures Handbook*. Washington, DC: ASM, 1992:8-11.
6. International Epizootics Organizations. *Manual of standards for diagnostic tests and vaccines: Influenza*. 3a.ed. france: IEO, 1996.
7. Instituto de Medicina Tropical /OMS/ OPS/ISIIC. *Manual de procedimientos para el diagnóstico de laboratorio de las infecciones respiratorias agudas de etiología viral*. 1a. ed. Cuba. Noviembre, 2003.
8. Centers for Diseases Control and Prevention. *Influenza Reagent kit for the identification of influenza isolates*. Georgia: CDC, 1996.
9. WER.CDC. *Influenza (Flu) . Influenza Summary, 2000-2001 Season*. Report prepared: June, 2001. Disponible en: <http://www.cdc.gov>
10. WER. CDC. *Influenza (Flu). Influenza Summary, 2004-2005 Season*. Report prepared: July, 2006. Disponible en: <http://www.cdc.gov>
11. Centro Nacional para animales de laboratorio:Animales producidos y/o mantenidos en barreras. Cuba. CENPALAB,1995.
12. Kruse RH, puckett WH, Richardson JH. *Biological Safety Cabinetry*. *Clin Microb Rev* 1991;4(2):207-241.
13. Couch RB, Kasel JA. Influenza. En: Lennette EH, Lennette DA, Lennette E, editores. *Diagnostic procedures for viral, rickettsial and*

- chlamydial infections.7a.ed.USA: American Public Health Associations, 1995.
14. Lowry OR, Rosebrough NJ, Randall RJ. Protein measurement with polinphenol reagent. *J Biol Chem* 1951; 193(20):265-275.
 15. Takase H, murakami Y, endo A, Ikeuchi T. Antibody responses and protection in mice immunized orally against influenza virus. *Vaccine* 1996; 14(17/18):1651-1656.
 16. Johansson B, Grajower B, Kilbourne E. infection permissive immunization with influenza virus neuroamidase prevents weight loss in infected mice. *Vaccine* 1993; 11(10):1037-1039.
 17. Murphy B, Robert G. Orthomixoviruses: Influenza. En: Fields BN, Knipe DM, Howley P. *Fields Virology*. Volumen 1. New York: Lippincott-Raven, 2001.
 18. Almeida B, Gregoriadis G, Potter C, Jennings R. immunopotential of local and systemic humoral immune responses by ISCOMS, liposomes and FCA: role in protection against influenza A in mice. *Vaccine* 1993;11(13):1302-1309.
 19. Potter C, Tamizar H, Jennings R. Immune response of mice to immunization with subunit influenza A. *Vaccine* 1995;13(3):253-260.
 20. Yakhno MA, Yamnikova SS, Zakstelskaya L. effective methods for production of antiserum to H3 hemagglutinin. *Voprosy Virusologii* 1978; 4(4):498-501.
 21. Belshe RB, Couch RB, Glezen WP, Treanor JT. Live attenuated intranasal influenza vaccine. *Vaccine* 2002; 20:3429-30.
 22. Tomoda T, Morita H, Kurashige T, Massab H. Prevention of influenza by intranasal administration of cold-recombinant, live attenuated influenza virus. *Vaccine* 1995;13(2):185-190.
 23. Hilleman MR. Realities and enigmas of human viral influenza: patogenesis, epidemiology and control. *Vaccine* 2002; 20: 3068-87.
 24. Sugaya N. Influenza. *Nipón Rinsho* 2003; 61 Suppl 2: 135-40.
 25. Ellis J, Chakraverty P, Clewley J. Genetic and antigenic variation in the hemagglutinin of recently circulating human influenza A(H3N2) virus in the United Kingdom. *Arch Virol* 1995; 140(11): 1889-1904.
 26. World Health Organization. Influenza: Antigenic activity of recent Influenza virus isolates and Influenza activity in the Southern hemisphere. *Wkly Epidemiol Rec* 1995; 70(39):277-280.
 27. CDC. Update: Influenza activity - United States and Worldwide, 1995-96 season, and composition of the 1996-97 influenza vaccine. *MMWR* 1996;45:326-29.
 28. National Advisory Committee on Immunization. Statement on influenza vaccination for the 1996-97 season. *CCDR* 1996;22:89-97.
 29. WER.CDC. Influenza (Flu) . *Influenza Summary*, 2003-2004 Season. Report prepared: June, 2004. Disponible en: <http://www.2a.cdc.gov>

Production of a specific antiserum against strain A/Johannesburg/33/94 (H3N2), and its usefulness in characterizing isolations of Influenza virus in Wistar rats

Abstract

A polyclonal antiserum with high titer, great specificity and sensitivity was obtained against the hemagglutinin of Influenza A/Johannesburg/33/94, belonging to subtype A (H3N2). The obtaining process of the antigen or immunogen, the immunization schedule and its administration to Wistar rats as animal model are described. All of these were validated by the hemagglutinin inhibition technique. The antiserum obtained was treated with receptor-destroying enzymes of national production (EDR/IPK) in order to eliminate the unspecific inhibitors of the hemagglutinin inhibition. Validation was carried out in front of a panel including 9 influenza reference strains belonging to subtypes A(H3N2), A(H1N1), and to type B. No unspecific reactions against strains A(H1N1) and of type B were detected. Five autochthonous isolates were satisfactorily typed and subtyped.

Keywords: Influenza virus, polyclonal antisera, antigenic characterization, hemagglutination inhibition.