

Următorul tabel trebuie privit ca un ghid orientativ față de răspunsurile normale ale efectivelor controlate după vaccinarile anti NDV:

Nivele titru	Semnificație
1/2 - 1/4	negativ
1/8	nesemnificativ și cert non-protecție
1/16 – 1/64 (pentru cel puțin 75% din probele testate)	o vaccinare cu vaccin viu în apa de băut - protecție corespunzătoare
1/32 – 1/128 (pentru cel puțin 75% din probele testate)	o vaccinare cu vaccin viu administrat oculo-conjunctival, prin aerosoli / spray - protecție corespunzătoare
1/128 – 1/512 (pentru cel puțin 75% din probele testate)	2 – 4 vaccinări cu vaccin viu – protecție corespunzătoare
1/512 – 1/2048 (pentru cel puțin 75% din probele testate)	- stare de imunitate înaltă, datorită vaccinărilor repetate cu vaccinuri vii (mai mult de 5 vaccinări) sau revaccinări cu vaccinuri inactivate sau - la titruri mai mari decât cele obișnuite pentru lotul testat (de ex. la tineret 1/4096): suspiciune de boală.

#### CONSERVARE

- Setul ND - KIT se păstrează la 2 – 8° C

#### VALABILITATE

24 luni, în limita termenului înscris pe eticheta cutiei.

#### MATERIALE NECESARE CARE NU SUNT FURNIZATE ÎN TRUSĂ

- pipete reglabile mono și multicanal (pentru 25μl)
- suspensie hematii 1%
- plăci de microreacție cu 96 de godeuri cu fund rotund sau în formă de V
- tampon fosfat salin pH 7,2 – 7,4
- sticlărie de laborator
- cronometru

#### OBSERVAȚII

- Componentele setului se folosesc numai împreună.
- Antigenul rehidratat se utilizează imediat sau poate fi păstrat cel mult 7 zile la 2-8°C.
- Reagenții se aduc la temperatura camerei (15-25°C) înaintea executării reacției.

#### PRODUCĂTOR

SC PASTEUR FILIALA FILIPEȘTI SRL  
Punct de lucru București Adresa: 333 Calea Giulesti, 060269,  
București, ROMANIA  
Tel: (+4021) 220 6920; Fax: (+4021) 220 6915

Rugăm însoțiți orice reclamație cu numărul seriei înscris pe etichetă

## SET ND – KIT PENTRU DETECȚIA ANTICORPILOR ANTI VIRUSUL BOLII DE NEWCASTLE

### DEȚINĂTORUL AUTORIZAȚIEI DE COMERCIALIZARE

Num: SC PASTEUR FILIALA FILIPEȘTI SRL  
Adresa: Str. Principală, nr. 944, Filipeștii de Pădure, jud. Prahova, ROMANIA  
Tel: +40(0)244 38.66.99; Fax: +40(0)244 38.60.32

### PREZENTARE

Setul ND - KIT reprezintă un ansamblu de componente pentru detecția și determinarea titrului anticorpilor față de virusul bolii de Newcastle din serul sanguin de pasăre, prin reacția de inhibare a hemaglutinării (IHA) micrometodă. Setul se utilizează în scop de diagnostic și pentru aprecierea statusului imunitar al efectivelor de păsări testate.

### COMPONENTELE SETULUI

- Antigen NDV liofilizat – suspensie virală, tulpina La Sota. Titrul hemaglutinant (T<sub>HA</sub>) este înscris pe eticheta flaconului.
- Ser pozitiv NDV, liofilizat. Titrul inhibohemaglutinant (T<sub>IHA</sub>) este înscris pe eticheta flaconului.
- Ser negativ, liofilizat
- Diluant pentru rehidratarea antigenului și a serurilor martor.

Component	Cantitate pentru 100 probe	Cantitate pentru 250 probe	Cantitate pentru 500 probe
Antigen (liofilizat)	1 fl. x 1 ml	2 fl. x 1 ml	3 fl. x 1 ml
Ser martor pozitiv (liofilizat)	1 fl. x 1 ml	2 fl. x 1 ml	3 fl. x 1 ml
Ser martor negativ (liofilizat)	1 fl. x 1 ml	2 fl. x 1 ml	3 fl. x 1 ml
Diluant	1 fl. x 4 ml	1 fl. x 6 ml	1 fl. x 10 ml
Instrucțiuni de utilizare a trusei	1 ex.	1 ex.	1 ex.

### MOD DE LUCRU

#### 1. Echilibrarea termică a reagenților

Componentele trusei se aduc la temperatura camerei (15-25°C) cu cel puțin 30 de minute înainte de lucru.

#### 2. Prepararea tamponului fosfat salin (TFS) în laborator

- Se cântăresc și se dizolvă în apă distilată sau deionizată următoarele substanțe:

- clorură de sodiu (NaCl) ..... 9 gr.
- fosfat disodic cu 12 molecule de apă (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 12 H<sub>2</sub>O) ..... 1,35 gr.
- fosfat monosodic cu o moleculă de apă (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x H<sub>2</sub>O) ..... 0,36 gr.
- apă distilată sau deionizată ..... 1 litru

Se corectează pH-ul soluției obținute astfel încât să fie cuprins între 7,2 – 7,4. Soluția obținută poate fi sterilizată prin autoclavare 20 minute la 121°C. Soluția TFS sterilizată poate fi păstrată la 2-8°C timp îndelungat.

#### 3. Prepararea suspensiei de hematii

- Păsările donatoare trebuie să fie lipsite de anticorpi anti NDV;
- Hematiile vor fi recoltate din vena axilară în soluție Alsever;
- Înainte de utilizare în test, hematiile se spală prin centrifugare și resuspendare în tampon fosfat salin TFS, de cel puțin 3 ori. Centrifugarea se realizează la 1500 – 2000 rpm, timp de 10-15 minute;
- Suspensia de eritrocite poate fi păstrată ca stoc, dacă după ultima centrifugare este diluată 1/2 cu TFS și stocată la 2-8°C timp de 4-5 zile;

- Concentrația suspensiei de hematii utilizată în test este de 1% în TFS (de exemplu: 0,5 ml suspensie hematii + 49,5 ml TFS).

#### 4. Verificarea componentelor setului ND - KIT

##### 4.1. Verificarea titrului HA al antigenului

Prepararea antigenului: antigenul se prezintă sub forma unei pastile liofilizate de culoare alb-gălbui. Pastila se rehidratează adăugând 1 ml diluant/flacon de antigen, obținându-se antigenul brut. Micrometoda IHA utilizează 4 unități hemaglutinante (UHA). Pentru prepararea diluției de lucru a antigenului (cu un titru HA ce conține 4 UHA), se împarte titrul antigenului înscris pe etichetă la 4.

De exemplu: titrul antigenului înscris pe eticheta flaconului este 256, iar titrul HA va fi 256:4 = 64.

Deci, antigenul brut rehidratat va fi diluat 1:64, adică la 1 ml antigen rehidratat se vor adăuga 63 ml tampon fosfat salin TFS.

(Notă: antigenul se poate prepara în cantitatea necesară pentru efectuarea testului în funcție de numărul de probe, păstrând însă proporțiile, de exemplu: 0,1 ml antigen rehidratat + 6,3 ml TFS).

Verificarea antigenului: se realizează prin tehnica de hemaglutinare directă (micrometodă):

- într-o placă de microreacție cu godeuri cu fundul rotund sau în formă de V se repartizează în primele 4 rânduri orizontale (A, B, C și D) câte 25  $\mu$ l TFS;
- în primul godeu din rândurile A, B și C se adaugă câte 25  $\mu$ l antigen brut, rehidratat și se omogenizează prin pipetări repetate; în aceste godeuri s-a realizat diluția 1/2 a antigenului brut;
- cu ajutorul unei pipete automate se realizează diluții seriale  $\log_2$  (1/4, 1/8, 1/16... 1/4096), transferând câte 25  $\mu$ l dintr-un godeu în următorul. După fiecare transfer se omogenizează suspensia prin pipetări repetate. Diluțiile se realizează până la ultimul godeu din rândurile A, B și C (rândul 12 vertical). Din ultimele godeuri se elimină câte 25  $\mu$ l suspensie;
- se repartizează câte 25  $\mu$ l TFS în toate godeurile din rândurile A, B, C și D;
- în toate godeurile rândurilor A, B, C și D se adaugă câte 25  $\mu$ l suspensie 1% hematii în TFS;
- placa de reacție se agită ușor și se lasă la temperatura camerei (15-25°C) timp de 40 de minute sau la 4°C timp de 60 de minute;
- după expirarea timpului alocat reacției, în rândul D (martorul de hematii) suspensia de hematii trebuie să se depună pe fundul godeului sub forma unui buton distinct. Titrul hemaglutinant al antigenului este dat de diluția corespunzătoare ultimului godeu unde hematii se află în mod evident în suspensie (absența butonului, ca o indicație a hemaglutinării). Hemaglutinarea trebuie să fie uniformă în cel puțin 2 din cele 3 rânduri A, B și C.

Titrul hemaglutinant astfel determinat trebuie să corespundă valorii înscrise pe eticheta flaconului cu antigen.

#### 4.2. Verificarea titrului IHA pentru serul martor pozitiv

Prepararea serului martor pozitiv: Serul martor pozitiv se prezintă sub forma unei pastile liofilizate de culoare alb-gălbui. Pastila se rehidratează în 1 ml TFS/flacon ser martor pozitiv, obținându-se serul pozitiv brut, căruia i se va verifica titrul IHA. Serul brut rehidratat se va dilua conform titrului IHA înscris pe eticheta flaconului sau conform titrului rezultat în urma verificării. De exemplu: titrul IHA înscris pe etichetă este 1/256. Serul pozitiv brut, rehidratat se va dilua 1:256, adică la 1 ml ser rehidratat se adaugă 255 ml TFS.

(Notă: serul pozitiv se poate prepara și în alte cantități, după necesități, dar păstrând proporțiile corespunzătoare diluției date de titrul IHA; de exemplu: 0,1 ml ser rehidratat + 25,5 ml TFS).

Verificarea serului martor pozitiv: se realizează prin tehnica de inhibare a hemaglutinării (micrometodă):

- într-o placă de microreacție cu godeuri cu fundul rotund sau în formă de V se repartizează în primele 4 rânduri orizontale (A, B, C și D) câte 25  $\mu$ l TFS;
- în primul godeu din rândurile A și B se adaugă câte 25  $\mu$ l ser martor pozitiv brut, rehidratat și se omogenizează prin pipetări repetate; în aceste godeuri s-a realizat diluția 1/2 a serului martor pozitiv brut;
- cu ajutorul unei pipete automate se realizează diluții seriale  $\log_2$  ale serului (1/4, 1/8, 1/16... 1/4096), transferând câte 25  $\mu$ l dintr-un godeu în următorul. După fiecare transfer se omogenizează diluțiile astfel realizate, prin pipetări repetate. Diluțiile se realizează până la ultimul godeu din rândurile A și B (rândul 12 vertical). Din ultimele godeuri se elimină câte 25  $\mu$ l suspensie;
- în toate godeurile rândurilor A, B și C se repartizează câte 25  $\mu$ l antigen diluat corespunzător titrului înscris pe etichetă (astfel încât să aibă 4 UHA);
- placa de reacție se agită ușor și se lasă la temperatura camerei (15-25°C) timp de 30 de minute sau la 4°C timp de 60 de minute;
- după expirarea timpului de reacție, în toate godeurile rândurilor A, B, C și D se adaugă câte 25  $\mu$ l suspensie 1% hematii în TFS;
- placa de reacție se agită ușor și se lasă la temperatura camerei (15-25°C) timp de 40 de minute sau la 4°C timp de 60 de minute;
- după expirarea timpului alocat reacției, în godeurile rândului D (martorul de hematii) suspensia de hematii trebuie să se depună pe fundul godeului sub forma unui buton roșu, distinct; în godeurile rândului C (martorul de antigen), hematii trebuie să fie în suspensie (absență buton). În godeurile din rândurile A și B, de la primul godeu până la godeul cu diluția corespunzătoare titrului IHA înscris pe eticheta serului, trebuie să se observe prezența butonilor distincți. Aceasta indică o inhibare a hemaglutinării, datorate prezenței anticorpilor anti NDV în ser. În următoarele godeuri, hematii trebuie să fie în suspensie (absență buton), în mod identic cu rândul C (martorul de antigen).

Titrul inhibo-hemaglutinant al serului martor pozitiv este dat reciproca diluției corespunzătoare ultimului godeului unde se observă în mod evident prezența butonului de hematii (în următoarele godeuri hematii fiind în suspensie).

Titrul inhibo-hemaglutinant al serului martor pozitiv trebuie să fie identic în cele două rânduri A și B.

Titrul inhibo-hemaglutinant astfel determinat trebuie să corespundă valorii înscrise pe eticheta flaconului cu ser martor pozitiv.

#### 4.3. Serul martor negativ

Prepararea serului martor negativ: serul martor negativ se prezintă sub forma unei pastile liofilizate de culoare alb-gălbui sau gălbui-roșcată. Pastila se rehidratează în 1 ml TFS/flacon de ser martor negativ, obținându-se serul negativ gata de utilizare.

#### 5. Testarea serurilor de analizat cu setul ND - KIT

Inactivarea serurilor de testat: Serurile de testat se inactivează pe baie de apă, la 56°C, timp de 30 de minute. Nu se testează serurile hemolizate sau contaminate bacteriologic. După inactivare, serurile se pot păstra 30 de zile la -20°C.

#### Executarea reacției IHA:

- cu ajutorul pipetei multicanal se repartizează câte 25  $\mu$ l TFS în toate godeurile plăcii de reacție (godeuri cu fund rotund sau în V);
  - se repartizează câte 25  $\mu$ l seruri de testat, în primul godeu din rândurile A, B, C, D, E și F; se repartizează 25  $\mu$ l ser martor pozitiv rehidratat în primul godeu din rândul G și 25  $\mu$ l ser martor negativ rehidratat în primul godeu din rândul H
  - pentru fiecare ser de testat și serul martor pozitiv se realizează diluții seriale  $\log_2$ , până la coloana 12 (1/2, 1/4... 1/4096); se elimină câte 25  $\mu$ l suspensie din godeurile corespunzătoare ultimei diluții;
  - pentru serul martor negativ se realizează diluții până la coloana 4 (1/16);
  - se repartizează câte 25  $\mu$ l din antigenul preparat în diluția de lucru corespunzătoare titrului (4 UHA), cu excepția godeurilor 5-12 din rândul H în care se adaugă câte 25  $\mu$ l TFS (aceste godeuri reprezintă martorul de hematii); pentru repartizare, se poate utiliza pipeta multicanal;
  - placa de reacție se agită ușor pentru omogenizare și se incubează la temperatura camerei (15-25°C) timp de 30 de minute sau la 4°C timp de 60 de minute;
  - după expirarea timpului de reacție, în toate godeurile plăcii de reacție se adaugă câte 25  $\mu$ l suspensie 1% hematii de găină, preparată în TFS; pentru repartizare, se poate utiliza pipeta multicanal;
  - placa de reacție se agită ușor pentru omogenizare și se incubează la temperatura camerei (15-25°C) timp de 40 de minute sau la 4°C timp de 60 de minute;
- După expirarea timpului alocat reacției, se interpretează rezultatele prin citirea reacțiilor din godeurile ce conțin serurile de testat și compararea lor cu reacțiile din godeurile rândurilor G și H, ce conțin martorii pozitiv și negativ și martorul de hematii. Titrul inhibo-hemaglutinant este dat de reciproca ultimei diluții a serului de testat pentru care se mai observă prezența evidentă a butonului de hematii.

#### CONDIȚIILE DE VALIDARE A TESTULUI

Testul este valid dacă:

- prin titrarea antigenului rehidratat se obține o valoare de titru HA similară celei înscrise pe eticheta flaconului; se admite o variație de  $\pm 1$  unitate logaritmică  $\log_2$  față de titrul HA înscris pe eticheta flaconului;
- prin titrarea serului martor pozitiv rehidratat se obține o valoare de titru IHA similară celei înscrise pe eticheta flaconului; se admite o variație de  $\pm 1$  unitate logaritmică  $\log_2$  față de titrul IHA înscris pe eticheta flaconului;
- serul martor negativ va da un titru mai mic de 4 (diluție 1/4).

#### INTERPRETAREA REZULTATELOR

Titrul IHA se exprimă ca reciproca diluției unde s-a produs inhibarea hemaglutinării 100%, deci butonul de hematii este similar ca în cazul martorului de hematii (rândul H5-H12). În următorul tabel sunt redată criteriile de interpretare, aplicate conform standardelor OIE (antigen cu 4 UHA):

Valoare titru IHA ( $T_{IHA}$ )	$T_{IHA} < 4$	Negativ
	$T_{IHA} = 8$	Suspect
	$T_{IHA} \geq 16$	Pozitiv

Testul trebuie interpretat pe baza anamnezei efectivului de păsări (vârstă, vaccinare etc) și poate fi repetat dacă este cazul. Se recomandă ca probele cu valori  $T_{IHA} = 8$  clasificate ca fiind suspecte să fie repetate. Pentru confirmare, pot fi efectuate și alte teste.



**ND - KIT**

Set pentru detecția anticorpilor anti-NDV prin reacția de inhibare a hemaglutinării



- antigen NDV 1 ml
- ser pozitiv NDV 1 ml
- ser negativ 1 ml
- diluant 4 ml

A se păstra la 2-8°C  
Se utilizează conform instrucțiunilor din anexă

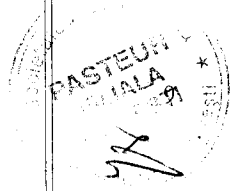
RO PASTEUR S.R.L. - Calea București nr. 244, Sector 4, București, România  
Tel: +40 214 386 888 / +40 214 386 899 / Fax: +40 214 386 032  
www.pasteur.ro

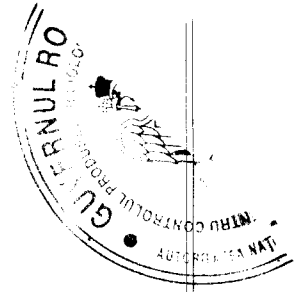
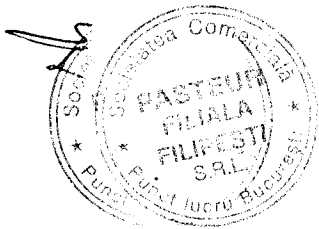
**Antigen NDV** 1 ml  
Cantitate necesară pentru 100 probe  
prin reacția de inhibare a hemaglutinării  
T<sub>max</sub> =  
Se păstrează la 2-8°C

**Diluant**  
Pentru setul ND-KIT  
4 ml  
Se păstrează la 2-8°C

**Ser pozitiv NDV** 1 ml  
Pentru detecția anticorpilor anti-NDV prin reacția de inhibare a hemaglutinării  
T<sub>max</sub> =  
Se păstrează la 2-8°C

**Ser negativ** 1 ml  
Pentru detecția anticorpilor anti-NDV prin reacția de inhibare a hemaglutinării  
T<sub>max</sub> =  
Se păstrează la 2-8°C





**ND - KIT**

Set pentru detectia anticorpilor anti NDV prin reactia de inhibare a hemaglutinarii

20 probe

- antigen NDV 2 ml
- ser pozitiv NDV 2 ml
- ser negativ 2 ml
- diluant 6 ml



Seriaz  
Echipa

A se pastora la 2-8°C

Se utilizeaza conform instructiunilor din datele tehnice

S.C. PASTEUR FILIALA FILIESTI SA  
Bucuresti, Calea Bucuresti nr. 94A, Filiala Filiești, Patarei, Romania  
Tel: +40 214 246 028; 40 214 310291; Fax: +40 214 310 032  
www.pasteur.ro

**Antigen NDV 2ml**

Proba de detectare anticorpilor anti NDV prin reactia de inhibare a hemaglutinarii

Titlu =

A se pastora la 2-8°C

Se utilizeaza conform instructiunilor din datele tehnice

Seriaz  
Echipa

**Diluant 6ml**

Uzina serozita NDV - KIT

6ml

A se pastora la 2-8°C

Se utilizeaza conform instructiunilor din datele tehnice

Seriaz  
Echipa

**Ser pozitiv NDV 2ml**

Proba de detectare anticorpilor anti NDV prin reactia de inhibare a hemaglutinarii

Titlu =

A se pastora la 2-8°C

Se utilizeaza conform instructiunilor din datele tehnice

Seriaz  
Echipa

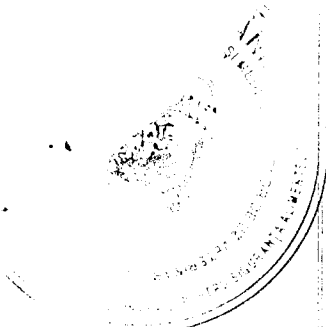
**Ser negativ 2ml**

Proba de detectare anticorpilor anti NDV prin reactia de inhibare a hemaglutinarii

A se pastora la 2-8°C

Se utilizeaza conform instructiunilor din datele tehnice

Seriaz  
Echipa



# ND - KIT

Set pentru detectia anticorpilor anti NDV prin reactia de inhibare a hemaglutinarii 500 probe

- antigen NDV	3 ml
- ser pozitiv NDV	3 ml
- ser negativ	3 ml
- diluant	10 ml

Se pastoreaza la 2-8°C  
Se utilizeaza conform instructiunilor din aceste plicule

**S.C. DASIA FILIPA FILIPESCU S.R.L.**  
Str. P. Poni nr. 62, P. 1, Sectorul 1, Bucuresti, Romania  
Tel. 40 41 20 888 Fax 40 41 20 889  
www.pastor.ro



**Antigen NDV** 3ml  
Faza de incalzire a suspensiei NDV  
prin reactia de inhibare a hemaglutinarii

Unitate

Se pastoreaza la 2-8°C

**Diluant**  
Faza de incalzire a suspensiei NDV  
10ml

Unitate

Se pastoreaza la 2-8°C

**Ser pozitiv NDV** 3ml  
Faza de incalzire a suspensiei NDV  
prin reactia de inhibare a hemaglutinarii

Unitate

Se pastoreaza la 2-8°C

**Ser negativ** 3ml  
Faza de incalzire a suspensiei NDV  
prin reactia de inhibare a hemaglutinarii

Unitate

Se pastoreaza la 2-8°C

