

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 si 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

Numa: 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 pasăre testate.

COMPONENTELE SETULUI

- Antigen NDV liofilizat - suspensie virală, tulpina La Sota. Titrul hemaglutinant (T_{HA}) este înscris pe eticheta flaconului.
- Ser pozitiv NDV, liofilizat. Titrul inihobemaglutinant (T_{IHA}) 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 (Na₂HPO₄ x 12 H₂O) 1,35 gr.
- fosfat monosodic cu o moleculă de apă (NaH₂PO₄ x H₂O) 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).

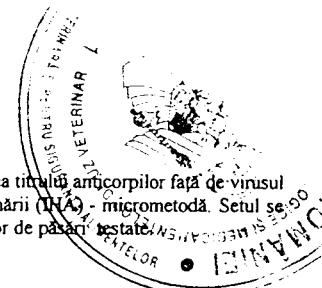
4. Verificarea componentelor setului ND - KIT

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 μ l TFS;
- în primul godeu din rândurile A, B și C se adaugă câte 25 μ 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 log₂ (1/4, 1/8, 1/16... 1/4096), transferând câte 25 μ 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 μ l suspensie;
- se repartizează câte 25 μ 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 μ 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 (marmorul de hematii) suspensia de hematii trebuie să se deponă pe fundul godeului sub forma unui buton distinct. Titrul hemaglutinant al antigenului este dat de diluția corespunzătoare ultimului godeu unde hematiile 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 mator pozitiv

Prepararea serului mator pozitiv: Serul mator pozitiv se prezintă sub forma unei pastile liofilizate de culoare alb-gălbui. Pastila se rehidratează în 1 ml TFS/flacon ser mator 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 mator 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 μ l TFS;
 - în primul godeu din rândurile A și B se adaugă câte 25 μ l ser mator pozitiv brut, rehidratat și se omogenizează prin pipetări repetate; în aceste godeuri s-a realizat diluția 1/2 a serului mator pozitiv brut;
 - cu ajutorul unei pipete automate se realizează diluții seriale log₂ ale serului (1/4, 1/8, 1/16... 1/4096), transferând câte 25 μ 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 μ l suspensie;
 - în toate godeurile rândurilor A, B și C se repartizează câte 25 μ 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 μ 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 (marmorul de hematii) suspensia de hematii trebuie să se deponă pe fundul godeului sub forma unui buton roșu, distinct; în godeurile rândului C (marmorul de antigen), hematiile 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, hematiile trebuie să fie în suspensie (absență buton), în mod identic cu rândul C (marmorul de antigen).
 - Titrul inhibohemaglutinant al serului mator pozitiv este dat reciproca diluției corespunzătoare ultimului godeului unde se observă în mod evident prezența butonului de hematii (în următoarele godeuri hematiile fiind în suspensie). Titrul inhibohemaglutinant al serului mator pozitiv trebuie să fie identic în cele două rânduri A și B.
- Titrul inhibohemaglutinant astfel determinat trebuie să corespundă valorii înscrise pe eticheta flaconului cu ser mator pozitiv.

4.3. Serul mator negativ

Prepararea serului mator negativ: serul mator 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 mator 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 μ l TFS în toate godeurile plăcii de reacție (godeuri cu fund rotund sau în V);
 - se repartizează câte 25 μ l seruri de testat, în primul godeu din rândurile A, B, C, D, E și F și se repartizează 25 μ l ser mator pozitiv rehidratat în primul godeu din rândul G și 25 μ l ser mator negativ rehidratat în primul godeu din rândul H
 - pentru fiecare ser de testat și serul mator pozitiv se realizează diluții seriale log₂, până la coloana 12 (1/2, 1/4, ... 1/4096); se elimină câte 25 μ l suspensie din godeurile corespunzătoare ultimei diluții;
 - pentru serul mator negativ se realizează diluții până la coloana 4 (1/16);
 - se repartizează câte 25 μ 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 μ l TFS (aceste godeuri reprezintă marmorul 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 μ 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 matorii pozitiv și negativ și marmorul de hematii. Titrul inhibohemaglutinant 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:

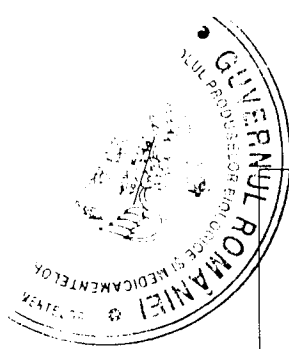
- prin titrarea antigenului rehidratat se obține o valoare de titru HA similară celei înscrise pe eticheta flaconului; se admite o variație de ± 1 unitate logaritmică log₂ față de titrul HA înscris pe eticheta flaconului;
- prin titrarea serului mator pozitiv rehidratat se obține o valoare de titru IHA similară celei înscrise pe eticheta flaconului; se admite o variație de ± 1 unitate logaritmică log₂ față de titrul IHA înscris pe eticheta flaconului;
- serul mator 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 marmorului de hematii (rândul H5-H12). În următorul tabel sunt redate 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} ≥ 16	Pozitiv

Testul trebuie interpretat pe baza anamnezei efectivului de păsări (vârsta, 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 detectia anticorpilor anti NDV
prin reactia de inhibare a hemaglutinarii

100 probe

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



Seria:
Exp:

A se pastra la 2-8°C
Se utilizeaza conform instructiunilor anexate



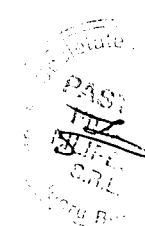
Produs de
SC DAN TEREMIA AHD PASTI SRL
Calea Unirii 333 060269 Buziasa, Romania
Tel: (+4021) 220 6480 Fax: (+4021) 220 6913
E-mail: pasticuri@pasticuri.ro web: www.pasticuri.ro

Antigen NDV 1 ml
Pentru detectia anticorpilor anti NDV
prin reactia de inhibare a hemaglutinarii
T_{HA} =
Se păstrează la 2-8°C
Seria: Valab:

Diluant
Pentru setul ND - KIT
4 ml
Se păstrează la 2-8°C
Seria: Valab:

Ser pozitiv NDV 1 ml
Pentru detectia anticorpilor anti NDV
prin reactia de inhibare a hemaglutinarii
T_{HA} =
Se păstrează la 2-8°C
Seria: Valab:

Ser negativ 1 ml
Pentru detectia anticorpilor anti NDV
prin reactia de inhibare a hemaglutinarii
Se păstrează la 2-8°C
Seria: Valab:





ND - KIT

Set pentru detectia anticorpilor anti NDV prin reactia de inhibare a hemaglutinarii **250 probe**

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

A se pastra la 2-8°C
Se utilizeaza conform instructiunilor anexate

Produs Stoc
SC PASTORIELEA ACHIDUS SRL
Calea Comleului 333, Iordani, Buzesti, Romania.
Tel: (+4021) 220.6480 Fax: (+4021) 220.6985
E-mail: pasteur.pastorie.ro web: www.pastorie.ro

Seria: _____
Exp: _____

Antigen NDV 2 ml

Pentru detectia anticorpilor anti NDV prin reactia de inhibare a hemaglutinarii

T_{HA} = _____

Se păstrează la 2-8°C

Seria: _____ Valabil: _____

Diluant

Pentru setul ND - KIT

6 ml

Se păstrează la 2-8°C

Seria: _____ Valabil: _____

Ser pozitiv NDV 2 ml

Pentru detectia anticorpilor anti NDV prin reactia de inhibare a hemaglutinarii

T_{HA} = _____

Se păstrează la 2-8°C

Seria: _____ Valabil: _____

Ser negativ 2 ml

Pentru detectia anticorpilor anti NDV prin reactia de inhibare a hemaglutinarii

Se păstrează la 2-8°C

Seria: _____ Valabil: _____





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



Seria:
Exp:

A se pastra la 2-8°C
Se utilizeaza conform instructiunilor anexate

Producator
SC PASTERILIA ALIPIESTI SRL
Calea Gimcescu 333 060764 Bucuresti, Romania.
Tel: (+40)211 220688 Fax: (+40)211 2206915
E-mail: pasteria@pasteria.ro web: www.pasteria.ro

Antigen NDV 3 ml
Pentru detectia anticorpilor anti NDV
prin reactia de inhibare a hemaglutinarii
T_{HA} =
Se păstrează la 2-8°C
Seria: Valab:

Diluant
Pentru setul ND - KIT
10 ml
Se păstrează la 2-8°C
Seria: Valab:

Ser pozitiv NDV 3 ml
Pentru detectia anticorpilor anti NDV
prin reactia de inhibare a hemaglutinarii
T_{HA} =
Se păstrează la 2-8°C
Seria: Valab:

Ser negativ 3 ml
Pentru detectia anticorpilor anti NDV
prin reactia de inhibare a hemaglutinarii
Se păstrează la 2-8°C
Seria: Valab:

