



PROSPECTUL PRODUSULUI

ND-TEST

-Set de diagnostic serologic pentru boala de Newcastle-

1. NUMELE ȘI ADRESA DEȚINĂTORULUI AUTORIZAȚIEI DE COMERCIALIZARE ȘI A DEȚINĂTORULUI AUTORIZAȚIEI DE FABRICAȚIE

ROMVAC COMPANY S.A.

Șos. Centurii nr. 7, 077190 Voluntari, Jud. Ilfov

E-mail: romvac@romvac.ro;

Telefon: 0318 243 051; 0318 243 052

Fax: 021.350 31 10

2. CARACTERISTICILE SETULUI

2.1. Setul ND-TEST este utilizat pentru determinarea prin reacția de inhibohemaglutinare a titrului anticorpilor contra virusului pseudopestei aviare.

3. COMPONENTELE SETULUI

3.1. Setul ND-TEST este format din:

- a) Antigen, reprezentat de o suspensie de virus al pseudopestei aviare, tulpina La Sota, stabilizat și liofilizat. Titrul hemaglutinant (HA) al antigenului este înscris pe eticheta flaconului.
- b) Ser pozitiv obținut de la păsări SPF după hiperimunizare contra pseudopestei aviare, este prezentat sub formă liofilizată. Titrul inhibohemaglutinant (IHA) al serului este înscris pe eticheta flaconului.
- c) Serul negativ este reprezentat de ser obținut de la păsări SPF, fiind prezentat sub formă liofilizată.
- d) Diluantul este o soluție tampon fosfat salin (TFS) cu pH 7,2-7,4 ± 0,15%.

4. INDICAȚII

4.1. Setul ND-TEST se folosește în scop de diagnostic și pentru aprecierea gradului de imunitate umorală prin reacția de inhibohemaglutinare la păsări vaccinate contra pseudopestei aviare.

5. MATERIALE DE LUCRU

5.1. Setul ND-TEST este destinat determinării titrului de anticorpi inhibohemaglutinanți prin micrometodă, folosind micropipeta multicanal cu sistem de reglare a dozajului între 0-200 microlitri. Pentru a efectua testul IHA sunt necesare următoarele elemente:

5.1.1.1. Pipeta multicanal reglată la 25 microlitri;

5.1.1.2. Pipeta unicanal cu dozaj reglabil la 25 microlitri;

Pipetele automate au două poziții de lucru:

a). o poziție care măsoară cantitatea fixată pe micropipetă (prima apăsare);

b). o poziție care eliberează întreaga cantitate din micropipetă și care reprezintă cantitatea măsurată și o cantitate tampon, de rezervă. Pentru a elibera cantitatea de reagent din micropipetă, necesară testului, se apasă butonul pipetei până la prima poziție.

5.1.1.3. Setul ND-TEST cuprinde (antigen, ser pozitiv, ser negativ, diluant);

5.1.1.4. Suspensia de eritrocite de pasăre 1% (pct. 12.1);

5.1.1.5. Plăci de microreacție cu godeuri în formă de V;

5.1.1.6. Tampon fosfat salin (TFS) cu pH 7,2-7,4 (pct.12.2);

5.1.1.7. Sticlărie de laborator (pipete gradate de 1, 2, 5, 25, baloane Erlenmeyer, baloane rotunde cu fund plat).

6. VERIFICAREA REAGENTILOR DIN SETUL ND-TEST

6.1. Antigenul. Antigenul se prezintă sub forma unei pastile liofilizate de culoare alb-gălbuie. Pastila se reconstituie adăugând 1 ml diluant, obținându-se antigenul brut. În reacția de IHA se utilizează antigen cu 4 UHA. Pentru prepararea acestuia se împarte titrul antigenului înscris pe etichetă la 4 (exemplu titru HA 128: 4 = 32). La antigenul brut (1 ml) se adaugă 31 ml TFS, pentru obținerea antigenului de lucru.

- într-o placă de reacție cu microgodeuri în formă de V se repartizează în primele 4 godeuri (rândurile orizontale A, B, C, D) câte 25 microlitri de TFS cu micropipeta automată;
- în primul godeu din rândurile A, B și C se repartizează câte 25 microlitri din antigenul brut;
- se execută cu micropipeta diluții seriate $\log_2$ (1/2, 1/4, 1/8 ---) până la ultimul godeu din rândurile A, B, C, transferând câte 25 microlitri dintr-un godeu în altul. Diluțiile se realizează până la rândul 12 vertical, omogenizând de 4-5 ori fiecare diluție înainte de a transfera în godeul următor;
- se repartizează în toate godeurile din placa de reacție, câte 25 microlitri din suspensia de eritrocite 1% preparată ca la pct. 6.1.
- placa de reacție se agită ușor și se lasă în repaus 40 minute la temperatura laboratorului sau 60 minute la +4°C. În acest interval suspensia de eritrocite din rândul D trebuie să se depună la fundul godeului sub formă de buton distinct. Titrul hemaglutinant este determinat în godeul unde se observă prezența eritrocitelor în suspensie, urmată de godeul cu eritrocitele depuse sub formă de buton. Hemaglutinarea trebuie să fie uniformă în cel puțin două din cele trei rânduri A, B, C. Titrul HA trebuie să corespundă cu cel înscris pe etichetă.

6.2. Serul pozitiv. Serul pozitiv se prezintă sub forma unei pastile liofilizate de culoare brun-roșietică. Pastila se reconstituie în 1 ml de TFS (ser pozitiv brut) și apoi se diluează corespunzător titrului IHA înscris pe etichetă. De exemplu: titrul IHA este 1/128. Serul pozitiv reconstituit la 1 ml se diluează cu încă 127 ml TFS sau se determină titrul inhihoemaglutinant (IHA) al serului pozitiv.

Verificarea titrului IHA pentru serul pozitiv:

- se repartizează în placa de reacție, în toate godeurile din rândurile A, B, C, D orizontal, câte 25 microlitri de TFS;
- se repartizează în primul godeu din rândurile A și B 1 vertical, câte 25 microlitri din serul pozitiv brut; executându-se diluții seriate $\log_2$ (1/2, 1/4, 1/8 ---) în godeurile următoare prin transferul a câte 25 microlitri dintr-un godeu în altul. Diluțiile se realizează până la coloana 12 vertical, omogenizând de 4-5 ori fiecare diluție înainte de a o transfera în godeul următor;
- se repartizează în godeurile din rândurile A, B și C, câte 25 microlitri de antigen cu 4 UHA. Placa se lasă în repaus timp de 30 minute la temperatura laboratorului sau 60 minute la temperatura de +4°C;
- se adaugă în toate godeurile din rândul A, B, C și D, câte 25 microlitri de suspensie 1% de eritrocite. Placa se agită ușor și se lasă în repaus la temperatura laboratorului timp de 40 minute sau 60 minute la temperatura de +4°C. După expirarea timpului de reacție în rândul D din placă, eritrocitele trebuie să fie depuse la fundul godeului, formând un buton roșu. În godeurile din rândul C trebuie să se observe eritrocite în suspensie. În godeurile din rândurile A și B până la diluția 1: 128 trebuie



să se observe o inhibare a hemaglutinării, adică eritrocitele depuse sub formă de buton la fundul godeului, după care se observă eritrocite plutind în suspensie, identic ca în godeurile din rândul C. Titrul IHA se apreciază la ultimul godeu unde butonul de eritrocite este evident, iar în următorul se observă eritrocite în suspensie. Titrul inhibohemaglutinant trebuie să fie identic în ambele rânduri A și B. El reprezintă reciproca diluției de ser unde IHA este completă. Titrul IHA trebuie să corespundă cu cel înscris pe etichetă.

6.3. Serul negativ. Serul negativ reprezintă ser recoltat de la păsări SPF, prezentându-se sub formă liofilizată (pastilă gălbui-roșcată). Reconstituirea lui se face prin adăugarea în flacoane de liofilizare a 5 ml TFS. Pastila se dizolvă instantaneu, obținându-se serul negativ pentru lucru.

7. EXECUTAREA REACȚIEI IHA FOLOSIND SERURILE DE TESTAT.

7.1. Serurile de testat sunt inactivate 30 minute la 56°C, într-o baie Wassermann. Serurile necorespunzătoare, adică hemolizate și contaminate bacteriologic, se exclud de la reacție. După inactivare serurile se pot conserva 30 zile la temperatura de -18°C.

7.2. Executarea reacției IHA;

- a) se repartizează cu micropipeta multicanal în toate godeurile din placa de reacție câte 25 microlitri de TFS;
- b) în godeurile din rândul 1 vertical, se repartizează individual cu o pipetă unicanal câte 25 microlitri din serurile de testat individualizate;
- c) cu o pipetă multicanal se execută diluții succesive de ser până la rândul 10 vertical pentru prima placă și apoi până la ultimul rând pentru următoarele plăci;
- d) se repartizează antigenul în diluția de lucru (4UHA) cu o pipetă multicanal în toate godeurile, cu excepția godeurilor din coloana 12 A, B, C, D. În godeurile din coloana 12 se repartizează 25 microlitru de TFS de la A la D;
- e) în godeurile din coloana 11 A, B, C, D se adaugă câte 25 microlitri din serul pozitiv diluat pentru lucru, iar în godeurile din coloana 11 E, F, G, H, câte 25 microlitri din serul negativ diluat;
- f) placa de reacție se agită ușor și se lasă în repaus la temperatura camerei timp de 40 minute sau 60 minute la temperatura de +4°C;
- g) după expirarea timpului, în placa de reacție se adaugă câte 25 microlitri cu pipeta multicanal, din suspensia de eritrocite 1% preparată ca la pct. 12.1;
- h) placa se agită ușor și se lasă în repaus la temperatura laboratorului 40 minute sau 60 minute la temperatura de +4°C;
- i) interpretarea reacției trebuie să se execute după citirea reacțiilor din godeurile din coloana 11 și 12, care trebuie să se prezinte astfel:
 - coloana 11 A, B, C, D, eritrocitele trebuie să fie depuse sub formă de buton (martor ser pozitiv);
 - coloana 11 E, F, G, H, eritrocitele trebuie să plutească în suspensie (martor ser negativ);
 - coloana 12, godeurile A, B, C, D, eritrocitele vor fi depuse la fundul godeului sub formă de buton (martor eritrocite).
 - coloana 12 E, F, G, H, eritrocitele trebuie să prezinte reacție de hemaglutinare (martor antigen);

7.3. Serurile de testat sunt notate individual la diluția unde s-a produs inhibohemaglutinarea. Titrul se exprimă ca reciproca diluției unde s-a produs inhibohemaglutinarea 100%, adică butonul de eritrocite este evident ca la martor (coloana 12 A, B, C, D). Conform standardelor OIE, testul este pozitiv dacă se produce o inhibiție a hemaglutinării la diluția de minimum 1/16 a serului de testat, utilizându-se antigen cu 4UHA.



Valoare titru IHA	T IHA $\leq$ 4 Negativ
	T IHA = 8 Suspect
	T IHA $\geq$ 16 Pozitiv

Monitorizarea statusului imun al efectivelor de păsări vaccinate contra pseudopestei aviare (PPA) se va face obligatoriu, după 14 zile de la ultima vaccinare în cazul vaccinurilor vii și după 21 zile de la imunizarea cu vaccinuri inactivate. În baza observațiilor de laborator și a supravegherii epidemiologice efectuate pentru evaluarea statusului imun față de virusul PPA, utilizând setul ND-TEST, considerăm că:

NIVEL TITRU IHA	SEMNIFICATIE
1/2-1/4	Negativ
1/8	Fără protecție
1/16 (2^4) – 1/128 (2^7)	Titururi obținute după prima vaccinare contra PPA, la 75% din probele testate. Aceste titururi sunt obținute în cazul aplicării vaccinurilor pe cale oculo/nazală, spray sau aerosoli; în situația administrării vaccinurilor în apa de băut sau pe cale injectabilă, titrurile obținute sunt mai mici cu o diluție. PROTECȚIE CORESPUNZĂTOARE
1/128 (2^7) – 1/256 (2^8)	Titururi obținute la efectivele de păsări cu 2-4 vaccinări contra PPA, la 75% din probele examinate. PROTECȚIE CORESPUNZĂTOARE
1/512 (2^9) – 1/2048 (2^{11})	Titururi obținute pentru efectivele cu mai mult de 5 vaccinări, inclusiv cele imunizate cu vaccinuri inactivate, la 75% din probele examinate. PROTECȚIE CORESPUNZĂTOARE - STARE DE IMUNITATE INALTĂ
$> 1/4096$ (2^{12})	În situațiile decelării unor titururi mai mari de $1/4096$ (2^{12}) sau la diluții mai mari, este obligatoriu de efectuat ancheta epidemiologică și examenul virusologic de laborator (suspiciune de boală).

8. MODUL DE PREZENTARE

8.1. Setul ND-TEST conține trei elemente (antigen, ser pozitiv și ser negativ) sub formă liofilizată și diluantul pentru rehidratarea acestora, fiecare flacon având înscris pe etichetă titrul HA sau IHA. Setul conține 50, 100, 200 sau 400 doze.

9. VALABILITATEA

9.1. Valabilitatea produsului este de 2 ani de la data preparării, în condițiile păstrării la $+4^{\circ}+8^{\circ}\text{C}$.

10. CONDITII DE PASTRARE SI TRANSPORT

10.1. Păstrarea setului se realizează la temperatura de $+4^{\circ}+8^{\circ}\text{C}$ și se transportă cu mașini frigorifice, lăzi izoterme etc.

11. PRECAUTII

11.1. Antigenul reconstituit se folosește imediat sau poate fi păstrat la frigider cel mult 48 de ore.

12. APENDIX

12.1. Prepararea suspensiei de eritrocite.

12.1.1. Păsările donatoare trebuie să fie lipsite de anticorpi ai pseudopestei aviare.

12.1.2. Pentru recoltarea sângelui din vena axilară se utilizează soluția de EDTA sau citrat de sodiu 4%, în proporție de 3 părți sânge și o parte soluție anticoagulantă.

12.1.3. Spălarea eritrocitelor se va efectua prin centrifugarea și resuspendarea în TFS a eritrocitelor de cel puțin 3 ori. Suspensia de eritrocite va fi centrifugată la 1200-1500 rpm timp de 10 minute.

12.1.4. Suspensia de eritrocite poate fi păstrată sub formă de soluție stoc, dacă după ultima centrifugare este diluată 1/1 cu TFS și conservată la 4°C timp de 4-6 zile.

12.1.5. Concentrația suspensiei de eritrocite folosită pentru HA și IHA este de 1% în TFS. Aceasta se prepară prin adăugarea a 1 ml de eritrocite (rezultate după centrifugare și îndepărtarea supernatantului), la 99 ml TFS.

12.2. Prepararea tamponului fosfat salin (TFS) în laborator.

12.2.1. Se cântăresc și se dizolvă în apă (în ordinea cântăririi) următoarele substanțe:

- clorură de sodiu (NaCl)..... 9 g
- fosfat disodic cu 12 mol. H₂O (Na₂HPO₄ 12 H₂O) 1,35 g
- fosfat monosodic (NaH₂PO₄ H₂O) 0,36 g
- apă bidistilată sau deionizată 1 l

12.2.2. Soluția obținută are un pH cuprins între 7,2-7,4. Ea poate fi sterilizată la autoclav 20 minute la temperatura de 121°C. Soluția de TFS sterilizată poate fi păstrată la frigider timp îndelungat. Soluțiile nesterilizate nu pot fi păstrate, prin conservare, la frigider mai mult de 24 ore.

12.3. Curățirea godeurilor plăcii de microreacție

12.3.1. Plăcile sunt spălate cu apă de robinet după utilizare.

Atenție ! Plăcile nu rămân cu reagenți după utilizare.

12.3.2. Plăcile se cufundă în soluție de fenol 1% timp de o oră.

12.3.3. Plăcile sunt curățate în jet de apă pentru a îndepărta urmele de fenol.

12.3.4. Plăcile sunt clătite cu apă deionizată de 3-4 ori. Fiecare spălare va avea o durată de 10-15 minute.

12.3.5. Plăcile vor fi scurse și uscate la termostat la temperatura de 37°C. Curățirea plăcilor este necesară după fiecare utilizare.

Ultima revizie a Prospectului: Iunie 2021

Atenție ! Plăcile nu trebuie curățate cu detergenți sau praf de curățat.

Rezultatele lucrării depind în mare măsură de pregătirea plăcii de reacție (spălare, curățare, uscare etc.) și corectitudinea pipetării

Rugăm a însoți orice reclamație cu numărul de serie înscris pe eticheta flaconului.



ETICHETA PRIMARĂ

pentru setul de diagnostic ND-TEST

Eticheta primară (flacon)

ANTIGEN ND-TEST

Antigen pentru diagnosticul serologic al bolii de Newcastle prin testul de inhibohemaglutinare

Rehidratare: 1 ml

Nr. teste/flacon: 50, 100, 200, 400 teste

Mod de utilizare: *Conform prospectului*

Timp de așteptare: *Nu este cazul*

Nr. serie **Data expirării:**

Cod: B - 3597 **Depozitare:** +2°C/+8°C

NUMAI PENTRU UZ VETERINAR.

AUTORIZAȚIA DE COMERCIALIZARE:

SER POZITIV ND-TEST

Ser pozitiv pentru diagnosticul serologic al bolii de Newcastle prin testul de inhibohemaglutinare

Rehidratare: 1 ml

Nr. teste/flacon: 50, 100, 200, 400 teste

Mod de utilizare: *Conform prospectului*

Timp de așteptare: *Nu este cazul*

Nr. serie **Data expirării:**

Cod. B - 3597 **Depozitare:** +2°C/+8°C

NUMAI PENTRU UZ VETERINAR.

AUTORIZAȚIA DE COMERCIALIZARE:

SER NEGATIV ND-TEST

Ser negativ pentru diagnosticul serologic al bolii de Newcastle prin testul de inhibohemaglutinare

Rehidratare: 5 ml

Nr. teste/flacon: 50, 100, 200, 400 teste.

Mod de utilizare: *Conform prospectului*

Timp de așteptare: *Nu este cazul*

Nr. serie **Data expirării:**

Cod. B - 3597 **Depozitare:** +2°C/+8°C

NUMAI PENTRU UZ VETERINAR.

AUTORIZAȚIA DE COMERCIALIZARE:

DILUANT ND-TEST

Diluant pentru setul de diagnostic al bolii de Newcastle prin reacția de inhibare a hemaglutinării

Volum: 8 ml

Nr. teste/flacon: 50, 100, 200, 400 teste.

Mod de utilizare: *Conform prospectului*

Timp de așteptare: *Nu este cazul*

Nr. serie **Data expirării:**

Cod. B - 3597 **Depozitare:** +2°C/+8°C

NUMAI PENTRU UZ VETERINAR.

AUTORIZAȚIA DE COMERCIALIZARE:



Eticheta secundară (cutie)
pentru setul de diagnostic ND-TEST

ND - TEST

Set pentru diagnosticul serologic al bolii de Newcastle prin testul de inhibohemaglutinare

Declararea substanței active și a altor substanțe: *Antigen liofilizat*

Ser pozitiv liofilizat

Ser negativ liofilizat

Forma farmaceutică: *peletă liofilizată*

Dimensiunea ambalajului: *10 seturi x 50, 100, 200, 400 teste*

Specii țintă: *ND-TEST se utilizează în diagnosticul bolii de Newcastle la găini, curci, bibilici, fazani*

Indicații: *este utilizat în laboratoarele de diagnostic pentru confirmarea sau infirmarea bolii de Newcastle*

Mod de utilizare: *Conform prospectului*

Timp de așteptare: *Nu este cazul*

Data expirării:

Condiții speciale de depozitare și transport: *se depozitează la +2°C/+8°C, ferit de lumină și îngheț*

Precauții speciale: *Deșeurile se vor depozita în spații special amenajate*

NUMAI PENTRU UZ VETERINAR

A NU SE LĂSA LA ÎNDEMÂNA COPIILOR!

ROMVAC COMPANY S.A. Șos. Centurii nr. 7, 077190 Voluntari, Jud. Ilfov

E-mail: romvac @ romvac.ro; Telefon: 021.350 31 06; 021.350 31 07;

021.350 31 09; 021.352 00 70; Fax: 021.350 31 10; 021.352 75 84

Fax Livrări: 021.350 31 1

AUTORIZAȚIA DE COMERCIALIZARE:

Numărul seriei:

20