

INSTRUCTIUNI DE FOLOSIRE PESTITEST-R-FITC
PESTITEST-R-FITC – CONJUGAT PENTRU DIAGNOSTICUL PESTEII
PORCINE CLASICE PRIN IMUNOFLOURESCENTA DIRECTA

SCOPUL UTILIZARII:

PESTITEST-R-FITC ESTE UN CONJUGAT IMUNOFLOURESCENT UTILIZAT IN DETECTAREA VIRUSULUI PESTEII PORCINE CLASICE LA PORCUL DOMESTIC SI SALBATIC DIN PROBE BIOLOGICE (TONSILE, SPLINA, RINICHI, LIMFONODURI, PORTIUNEA DISTALA A ILEONULUI, MADUVA STERNALA).

INFORMATII GENERALE:

Pesta porcina clasica (CSF) este o boala virala contagioasa a porcilor. Agentul etiologic face parte din genul *Pestivirus*, familia *Flaviviridae* si este strans inrudit cu virusurile diareei virale bovine si cel ce cauzeaza boala de granita. Exista numai un serotip de virus CSF (CSFV).

Boala poate evolua in forma acuta, subacuta, cronica, cu debut tardiv sau inaparent in functie de varietatea de factori virali sau ai gazdei intre care varsta animalelor, virulenta virusului si timpul de infectie (pre- sau post-natal) sunt de importanta majora. Animalele adulte fac de obicei o boala cronica mai putin severa decât animalele tinere, având mai multe sanse de supravietuire. La scroafele gestante virusul poate trece bariera placentara si infecteaza fetusii. Infectia *in utero* a tulpinii virale moderate sau cu virulenta scazuta poate duce la asa-zisul sindrom de "scroafa purtatoare", urmat de mortalitate prenatala sau, imediat dupa fatarea purceilor, crestere de purcei bolnavi sau aparent sanatosi, dar infectati.

PRINCIPIUL METODEI

Testul de imunofluorescenta directa se utilizeaza pentru detectia antigenului VPPC in sectiuni criostatice din organele tinta pentru virus (tonsile, splina, rinichi, limfonoduri, portiunea distala a ileonului, maduva sternala). Testul este realizat cu un conjugat fluorescent obtinut din ser policlonal anti-VPPC ce reactioneaza specific cu antigenul VPPC din probele biologice. Complexul antigen-anticorp specific-FITC (conjugat cu FITC) format, este pus in evidenta la lumina ultravioleta.

COMPONENTELE TRUSEI

Produsul **Pestitest-R-FITC** cuprinde conjugatul fluorescent ambalat individual in flacoane ce contin 0.5 ml sau 1 ml, utilizat la dilutia de lucru de 1/50, necesar pentru efectuarea a 250 probe sau 500 probe in tehnica de imunofluorescenta directa.

Conjugatul fluorescent lichid reprezinta gamaglobulina (obtinuta din ser anti-VPPC de la porci liberi de gemeni) marcata cu izotiocianat de fluoresceina (FITC) izomer I.

Conjugatul este ambalat si etichetat / inscriptionat individual.

PRECAUTII

Conjugatul **PESTITEST-R-FITC** trebuie pastrat la -20°C si adus la temperatura camerei (20-25°C) inainte de utilizare. Odata inceput, lucrul trebuie continuat fara intreruperi.

CONDITII DE PASTRARE

Conjugatul **PESTITEST-R-FITC** se pastreaza la - 20°C, in ambalajul original.

PROBE DE EXAMINAT

Sectiuni criostatice din organe tinta (tonsile, splina, rinichi, limfonoduri, portiunea distala a ileonului) si frotiuri de maduva rosie sternala provenite de la porcul domestic sau salbatic

MODUL DE LUCRU

Produsul **Pestitest-R-FITC** cuprinde conjugatul fluorescent ambalat individual in flacoane ce contin 0.5 ml sau 1 ml, utilizat la dilutia de lucru de 1/50, necesar pentru efectuarea a 250 probe sau 500 probe in tehnica de imunofluorescenta directa.

8.1. Materiale necesare:

a) **Diluant pentru conjugat** format din solutie **tampon fosfat salin**, 0,1M, pH 7,2-7,4 cu Evans blau (0,5 mg/40 ml), utilizat la obtinerea dilutiei de lucru a conjugatului fluorescent (dilutie de lucru conjugat : 1/50).

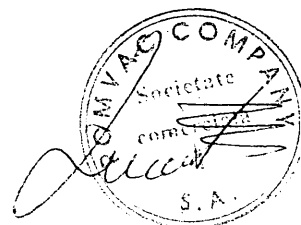
Modul de preparare tampon fosfat salin 0,1M:

Solutia A: 14,2 g Na_2HPO_4 anh.
8,5 g NaCl

ad. 1000 ml apa distilata.

Solutia B: 13,8 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$
8,5 g NaCl

ad. 1000 ml apa distilata.



Se adauga solutia B peste solutia A pana la un pH de 7,2 – 7,4 si se adauga Evans blau 0,5 mg/40 ml solutie tampon fosfat salin 0.1 M.

b) solutie tampon fosfat salin 0.01M, pH 7.2-7.4 pentru spalare :

Modul de preparare tampon fosfat salin 0,01M:

Solutia A: 14,5 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{ H}_2\text{O}$.

8,5 g NaCl

ad. 4000 ml apa distilata.

Solutia B: 1,4 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$

8,5 g NaCl

ad. 1000 ml apa distilata.

Se adauga solutia B peste solutia A pana la un pH de 7,2 – 7,4.

c) solutie tampon glicerinat

Tamponul glicerinat este mediul de montare al preparatelor testate cu conjugatul imunofluorescent.

Modul de preparare:

Se amesteca glicerina anhidra (90 ml) cu 10 ml tampon carbonat-bicarbonat (0,21 g bicarbonat de sodiu si 0,265 g carbonat de sodiu).

d) apa distilata/ deionizata; pipete mono- si multicanal, reglabile si fixe, 2-1000 μl ;

e) pipete sticla 10 ml; eprubete/ tuburi polietilena 1-2 ml si sticla 10-20 ml;

f) hartie absorbanta (filtru/sugativa); alcool sanitar; lamele de sticla ;

g) incubator 37 °C; baie de spalare prevazuta cu agitare;

h) microscop cu lumina ultravioleta.

8.3. Executarea testului

8.3.1. Pregatirea probelor de testat si a reagentilor pentru lucru

Pregatirea probelor de testat:

De la porcii bolnavi, imediat dupa sacrificare sau de la cadavre proaspete se recolteaza probele biologice (tonsile, splina, rinichi, limfonoduri, portiunea distala a ileonului, stern). Sectiunile criostatice si frotiurile de suc medular (maduva stemala rosie) se usuca la temperatura camerei si apoi se fixeaza in acetona timp de 10 minute.

Pregatirea lamelor martor de control:

Se pregatesc lame martor cu sectiuni criostatice din organe sau frotiuri de maduva stemala provenite de la porci negativi si pozitivi pentru pesta porcina clasica, cunoscuti.

Pregatirea conjugatului fluorescent pentru test:

Conjugatul lichid congelat, se decongeleaza la temperatura camerei si se dilueaza la dilutia de lucru 1/50 (specificata in instructiunile de folosire) cu diluantul pentru conjugat (punctul a) de la materiale necesare). Conjugatul diluat poate fi utilizat imediat sau in termenul de valabilitate in scris pe eticheta, daca este pastrat la congelator (- 20°C).

8.3.2. Modul de executare a testului de imunofluorescenta directa (IFD):

Sectiunile criostatice sau frotiurile (probele) se acopera cu un strat subtire si uniform din dilutia de lucru a conjugatului fluorescent (75-100 μl /proba). De asemenea, lama martor de control se acopera cu conjugat fluorescent diluat. Se incubeaza probele si lamele martor de control la 37°C, in camera umeda, timp de 30 minute, dupa care lamele se spala cu tampon fosfat salin 0,01M pH 7,2 – 7,4 (solutie tampon fosfat salin 0.01M, pH 7.2-7.4 pentru spalare, punctul b) de la materiale necesare), sub agitare magnetica usoara, timp de 10 minute.

Montarea lamelor peste preparate se realizeaza cu ajutorul solutiei tampon glicerinat (punctul c) de la materiale necesare). Examinarea probelor se face la microscopul cu lumina ultravioleta. Fluorescenta specifica este evidentiata printr-o coloratie verzuie sau galben verzuie a citoplasmei, nucleul celulelor ramanand necolorat. Datorita prezentei colorantului Evans blau (culoare de contrast), fondul preparatelor are o culoare rosie caramizie.

9. INTERPRETAREA REACTIEI

Reactie pozitiva: cu antigenul VPPC prezent in celule, se obtine o fluorescenta specifica in citoplasma celulelor din probe de testat, asemanatoare cu cea inregistrata la martorii pozitivi de reactie de pe lamele martor de control.

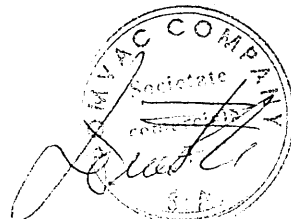
Reactie negativa: in absenta antigenului VPPC nu se obtine fluorescenta specifica in citoplasma celulelor din probele de testat, aspect asemanator cu cel inregistrat la martorii negativi de reactie de pe lamele martor de control.

10. NORME DE PROTECTIA MUNCII

Conjugatul si probele de examinat se manipuleaza cu atentie, evitandu-se contactul cu pielea si mucoasele si difuzarea in afara laboratorului.

11. VALABILITATE

24 de luni, in conditiile de pastrare mentionate.





MACHETE ETICHETE

PESTITEST-R-FITC

Forma de
prezentare
flacon x 0,5 ml

Eticheta primară

Eticheta
secundară

ROMANIA - ROMVAC COMPANY S.A. Voluntari Tel.: +4021-3503109

PESTITEST-R-FITC



Conjugat pentru diagnosticul pestei porcine clasice
prin imunofluorescență directă (IFD)

CONTINE: Flacoane x 0,5 ml conjugat fluorescent Seria 4 cod B- 34408

SPECII TINTA: Porcine.

INDICATII: Se folosește pentru diagnosticul infecției cu virusul pestei porcine clasice (VPPC) la porcul domestic și sălbatic, prin tehnica de imunofluorescență directă.

MOD SI CALE DE UTILIZARE: Conform instrucțiunilor de folosire.

VALABILITATE: 08.2012

DEPOZITARE SI TRANSPORT: Se păstrează la congelator (-20° C), în ambalajul original. Pe durata transportului se păstrează la +2° / +8° C nu mai mult de 48 ore.

PRECAUTII SPECIALE: Deseurile se vor depozita în locuri special amenajate.

A nu se lăsa la îndemana copiilor !

AUTORIZATIE DE COMERCIALIZARE:

- NUMAI PENTRU UZ VETERINAR -

ROMVAC COMPANY S.A.

PESTITEST-R-FITC



Conjugat fluorescent-VPPC

0,5 ml (50 x 1)

Conservare - 20° C Cod 34408

Seria 4 Valab. 08.2012

- PENTRU UZ VETERINAR -

flacon x 1 ml

ROMANIA - ROMVAC COMPANY S.A. Voluntari Tel.: +4021-3503109

PESTITEST-R-FITC



Conjugat pentru diagnosticul pestei porcine clasice
prin imunofluorescență directă (IFD)

CONTINE: Flacoane x 1 ml conjugat fluorescent Seria 4 cod B- 34408

SPECII TINTA: Porcine.

INDICATII: Se folosește pentru diagnosticul infecției cu virusul pestei porcine clasice (VPPC) la porcul domestic și sălbatic, prin tehnica de imunofluorescență directă.

MOD SI CALE DE UTILIZARE: Conform instrucțiunilor de folosire.

VALABILITATE: 08.2012

DEPOZITARE SI TRANSPORT: Se păstrează la congelator (-20° C), în ambalajul original. Pe durata transportului se păstrează la +2° / +8° C nu mai mult de 48 ore.

PRECAUTII SPECIALE: Deseurile se vor depozita în locuri special amenajate.

A nu se lăsa la îndemana copiilor !

AUTORIZATIE DE COMERCIALIZARE:

- NUMAI PENTRU UZ VETERINAR -

ROMVAC COMPANY S.A.

PESTITEST-R-FITC



Conjugat fluorescent-VPPC

1 ml (50 x 1)

Conservare - 20° C Cod 34408

Seria 4 Valab. 08.2012

- PENTRU UZ VETERINAR -

