



PLATELIATM RABIES II KIT

Ad Usum Veterinarium

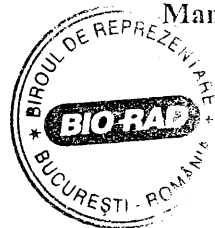
192 teste

Ref.: 355 0180

TRUSA PENTRU DETECTIA SI TITRAREA *IN VITRO* A IgG ANTI GLICOPROTEINA VIRUSULUI RABIC DIN SER DE CAINI, PISICI SI VULPI.

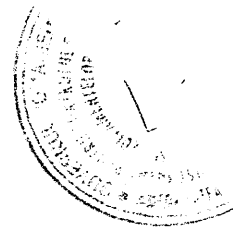
Toti reactivii produsi si comercializati sunt supusi unui sistem complet de control al calitatii, incepand cu receptia materialelor brute si pana la comercializarea finala a produsului. Fiecare lot este supus unui control de calitate si este eliberat spre vanzare numai daca este in conformitate cu criteriile de acceptare..

Manual de utilizare



CUPRINS

1. DOMENIUL DE UTILIZARE AL TRUSEI
2. INTERESUL ASUPRA TRUSEI PLATELIA RABIES II
3. PRINCIPIUL TESTULUI PLATELIA RABIES II
4. COMPOZITIA TRUSEI PLATELIARABIES II
5. PREPARAREA SOLUTIILOR DE REACTIVI
6. CONDITII DE STOCARE .-VALABILITATE
7. PROBE
8. PROTOCOLUL DE TESTARE
9. CALCULAREA SI INTERPRETAREA REZULTATELOR
10. ECHIPAMENTE SI MATERIALE NECESARE CARE NU SUNT FURNIZATE IN TRUSA
11. MASURI DE PRECAUTIE
12. LITERATURA





1. DOMENIUL DE UTILIZARE AL TRUSEI

Trusa PLATELIA RABIES II este un test de diagnostic *in vitro* de tip Elisa care permite detectia si titrarea IgG anti-glicoproteina virusului rabic in ser de provenienta animala (caini, pisici si vulpi).

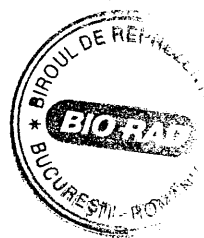
2. INTERESUL ASUPRA TRUSEI PLATELIA RABIES II

Rabia este una dintre cele mai vechi boli virale despre care se stie ca afecteaza atat oamenii, cat si animalele. Virusul rabiei este un virus puternic neurotrop si cauzeaza de cele mai multe ori o encefalita fatala la mamifere. Virusul este transmis in principal prin intermediul salivei in cazul muscaturilor de catre animale infectate. Programele de imunizare si control pentru protejarea populatiilor animale fata de virusul rabic au condus la eliminarea bolii in cateva tari vest-europene si in unele tari din America de Sud.

Incepand cu data de 3 Iulie 2004 se aplica o noua lege europeana care reglementeaza traficul international al carnivorelor domestice din tari in care exista cazuri de rabie in tari libere de rabie. Carnivorele domestice pot calatori daca serul lor contine cel putin 0.5 IU/ml (Unitati Internationale /ml) de anticorpi neutralizanti anti-rabie.

Titrarea anticorpilor anti-rabie are cateva aplicatii practice:

- ♦ Serologie individuala in scopul comertului international: anticorpilor anti-rabie se masoara in laboratoare specializate pentru a determina imunitatea animalelor vaccinate (pisici si caini). Un nivel al anticorpilor mai mare sau cel putin egal cu 0.5 IU/ml este considerat de catre expertii OIE drept nivel acceptabil de seroconversie, peste care vaccinarea poate fi considerata de succes.
- ♦ Confirmarea statusului de vaccinare in cadrul unei campanii de vaccinare: controlul anticorpilor anti-rabie permite evaluarea indirecta a eficientei vaccinarii in cazul campaniilor de vaccinare orala a animalelor salbatice (vulpi).



3. PRINCIPIUL TESTULUI PLATELIA RABIES II

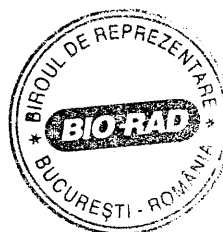
PLATELIA RABIES II este o tehnica imuno-enzimatica pentru detectia anticorpilor anti-glicoproteina virusului rabic. Acest test poate fi efectuat pe ser provenind de la oameni sau de la unele specii de animale – caine, pisica, vulpe.

Acest test se bazeaza pe utilizarea unei tehnici imunoenzimactice in faza solida, cunoscuta ca tehnica ELISA indirecta. O microplaca este invelita cu glicoproteina virala, extrasa din membrana virala inactivata si purificata. Conjugatul enzimatic este format din proteina A de la *Staphylococcus aureus* cuplata cu peroxidaza. Martorii pozitivi, calibrati fata de standarde OIE permit determinarea calitativa sau cantitativa a titrului anticorpilor anti-rabie in ser.

Implementarea testului cuprinde urmatoarele etape de reactie:

- 1) Serurile de testat, precum si Martorii Pozitivi sau Standardele de Cuantificare sunt distribuite in godeurile invelite cu glicoproteina ale microplacilor din trusa. In timpul etapei de incubare de o ora la 37°C, anticorpilor anti-rabie prezenti in probe se leaga la godeurile invelite cu glicoproteina ale microplacii. Dupa incubare, anticorpilor care au ramas nelegati, precum si alte proteine serice sunt inlaturate prin spalari.
- 2) Conjugatul (proteina A marcata cu peroxidaza) se adauga in godeurile microplacii. In timpul unei a doua etape de incubare de o ora la 37°C, anticorpilor marcati se leaga de complexe anticorpi anti-rabie – antigen fixate de godeurile microplacii. Conjugatul ramas liber este inlaturat prin spalari.
- 3) Prezenta complexelor imune este demonstrata prin adaugarea unei solutii continand substrat pentru peroxidaza si o substanta cromogena, ceea ce initiaza o reactie de dezvoltare a culorii
- 4) Dupa o incubare de 30 min. la temperatura camerei, reactia enzimatica este stopata prin adaugarea unei solutii H₂SO₄ 1N. Densitatea optica a citirii obtinuta cu un spectrofotometru setat la 450nm, cu citire de referinta la 620 nm este proportionala cu cantitatea de anticorpi anti-rabie prezenti in proba. Se realizeaza o curba standard pe baza standardelor de Cuantificare (S1 to S6), care se obtin prin dilutii seriale ale Martorilor Pozitivi calibrati R4b.

Valorile densitatii optice pentru probele necunoscute sunt comparate cu valorile Martorilor Pozitivi. Titrurile serurilor in testele de cuantificare pot fi obtinute dupa citirea directa pe curba standard si sunt exprimate ca Unitati Echivalente la 1ml (EU/ml), unitate echivalenta cu unitatile echivalente definite in seroneutralizare.

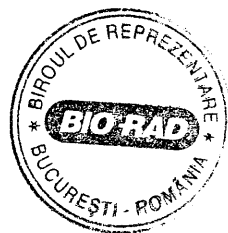


4. COMPOZITIA TRUSEI PLATELIA RABIES II

Toti reactivii sunt destinati exclusiv uzului veterinar *in vitro*.

Trusa contine o cantitate de reactivi suficienta pentru 2 x 96 teste. Pe fiecare placa pot fi analizate 90 probe in cazul in care se realizeaza o determinare calitativa. Daca se doreste un sistem cantitativ, pana la 80 probe pot fi cuantificate precis pentru anticorpi anti-rabici.

ETICHETARE	TIP DE REACTIV	PREZENTARE
R1	Microplaca: 12 barete de 8 godeuri sensibilizate cu glicoproteina virusului rabic	2 placi
R2	Solutie de spalare: tampon Tris-NaCl, 10x Conservant: Proclin™ 300 (0,01%)	1 sticla (250 ml)
R3	Martor Negativ: Martor areactiv TRIS-EDTA Conservant: Proclin™ 300 (0, 1%)	1 flacon (0.6 ml)
R4a	Martor Pozitiv 0,5 EU/ml: martor pozitiv calibrat 0.5 EU / ml Tampon glicina continand BSA (albumina serica bovina) si ser de caine cu IgG anti-rabie. Culoare galbena. Conservant: Proclin™ 300 (0,1%)	1 flacon (0.6 ml)
R4b	Martor Pozitiv 4 EU/ ml: martor pozitiv calibrat 4 EU/ml Tampon glicina continand BSA (albumina serica bovina) si ser de caine cu IgG anti-rabie. Culoare albastra. Conservant: Proclin™ 300 (0,1%)	1 flacon (0.6 ml)
R6	Diluant pentru proba: Tampon TRIS - EDTA gata de utilizare pentru diluarea probei. Culoare rosie. Conservant: Proclin™ 300 (0,1%)	2 sticle (2 x 125 ml)
R7	Conjugat: Solutie continand Proteina A – Peroxidaza si proteina bovina purificata. Tampon 10x concentrat. Culoare verde. Conservant : Proclin™ 300 (0,1%)	1 sticla (3 ml)
R8	Tampon substrat pentru peroxidaza: Solutie de acid citric si acetat de sodiu continand 0,015% H ₂ O ₂ si 4% dimetilsulfoxid (DMSO)	1 flacon (60 ml)
R9	Cromogen: Tetrametilbenzidina (TMB) solutie 0.25%	1 flacon (5 ml)
R10	Solutie de Stopare: solutie acid sulfuric 1N Folie adeziva pentru microplaci	1 flacon (28 ml) 6 folii



[Signature]

5. PREPARAREA REACTIVILOR

Nota:

Inainte de utilizare reactivii trebuie lasati timp de 30 minute sa ajunga la temperatura camerei (+18°C si +30°C).

Omogenizati reactivii prin agitare usoara inainte de deschiderea flacoanelor.

1. Reactivi gata de utilizare

- ♦ **Microplaci (R1):** Inainte de utilizare se recomanda lasarea microplacii sa atinga temperatura camerei (intre +18°C si +30°C) in ambalajul sau protector, pentru a evita condensarea apei in godeuri. Baretele neutilizate vor fi plasate imediat inapoi in ambalajul protector. Inchideti pachetul bine dupa eliminarea aerului, apoi stocati-l la o temperatura intre +2°C - +8°C.
- ♦ **Diluant pentru proba (R6)**
- ♦ **Solutie de Stopare (R10)**

2. Reactivi care trebuie reconstituiti

- ♦ **Solutie de spalare (R2)**

Diluati solutia 1/10 in apa distilata (de exemplu 100 ml of reactiv R2 in 900 ml apa distilata). Pentru o placa sunt necesari 500 ml.

- ♦ **Martor negativ (R3)**

Diluati solutia 1/100 in R6

- ♦ **Martor pozitiv 0,5 EU/ml (R4a)**

Diluati martorul pozitiv R4a 1/100 in R6

- ♦ **Martor pozitiv 4 EU/ml (R4b)**

Diluati martorul pozitiv R4b 1/100 in R6

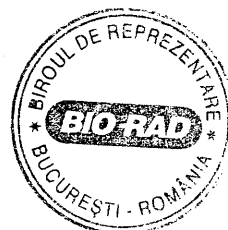
- ♦ **Conjugat (R7)**

Solutia este de 10x concentrata. Pentru a prepara solutia diluata de conjugat, adaugati 1 volum de solutie concentrata de conjugat la 9 volume de solutie de spalare (R2) preparata 1X. Pentru o microplaca intreaga sunt necesari 11 ml.

- ♦ **Solutie de dezvoltare enzimatica (R8 + R9)**

Diluati reactivul R9 1/11 in reactivul R8 (de exemplu: 0.1 ml reactiv R9 in 1 ml reactiv R8), tinand cont de faptul ca 11 ml solutie de revelare a reactiei enzimatice sunt suficienti pentru 1 microplaca.

Omogenizati usor. Evitati utilizarea unui agitator tip Vortex.



3. Prepararea Standardelor de Cuantificare pentru un test cantitativ

Fiecare test cantitativ care utilizeaza trusa PLATELIA RABIES II ar trebui sa include 6 Standarde de Cuantificare, de la S1 la S6.

Martorul pozitiv calibrat R4b (4 EU/ml) corespunde Standardului de Cuantificare S6.

Standardele de cuantificare S1-S5 se prepara prin dilutii seriale ale reactivului R4b. Dilutiile se efectueaza cu ajutorul diluantului pentru proba (reactiv R6).

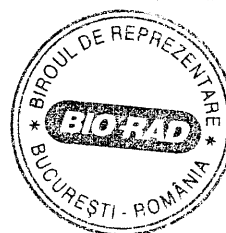
Standarde de Cuantificare		Concentratii obtinute prin dilutii seriale ale Martorului Pozitiv R4b
S1	S2 diluat la $\frac{1}{2}$	0.125 EU/ml
S2	S3 diluat la $\frac{1}{2}$	0.25 EU/ml
S3	S4 diluat la $\frac{1}{2}$	0.5 EU/ml
S4	S5 diluat la $\frac{1}{2}$	1 EU/ml
S5	S6 diluat la $\frac{1}{2}$	2 EU/ml
S6 = R4b	Reactiv R4b diluat la 1/100	4 EU/ml

6. CONDITII DE STOCARE - VALABILITATE

Toate componentele trusei PLATELIA RABIES II kit se stocheaza la temperature intre +2° si +8°C si pot fi utilizate pana la data de expirare indicate in trusa. Reactivul R2 (10 X) poate fi pastrat la o temperatura intre +2°C si +25°C inainte de reconstituire.

Valabilitatea reactivilor dupa preparare este urmatoarea:

	Reactiv	Observatii	Valabilitate
R1	Microplaca	Dupa deschiderea ambalajului cu banda de sigilare, baretele care nu au fost utilizate trebuie introduse inapoi in ambalaj, iar ambalajul trebuie resigilat.. Substanta deshidratanta trebuie sa ramana in ambalaj.	1 luna la +2°C - +8°C
R2	Solutie de spalare diluata		2 saptamani la +2°C - +8°C
R7	Solutie de conjugat diluata	Se recomanda ca solutia diluata de conjugat sa fie utilizata imediat	8 ore la +2°C - +8°C
R8 + R9	Solutie de dezvoltare reconstituita		6 ore la temperatura camerei (+18°C - +30°C), intotdeauna la intuneric



7. PROBE

- ♦ Testul PLATELIA RABIES II a fost dezvoltat pentru aplicarea sa in cazul serului de provenienta animala (caini, pisici, vulpi).
- ♦ Testul este realizat pe ser diluat 1/100 in reactiv R6.
- ♦ Probele se pastreaza la +2° pana la +8°C daca detectia se realizeaza in interval de 24 ore de la recoltare sau pot fi pastrate 6 luni la -20°C. Probele pot fi supuse la 3 cicluri de congelare-decongelare. Probele congelate anterior trebuie omogenizate bine dupa decongelare, in vederea testarii.

NB : Eliminati prin centrifugare, daca este necesar particulele de fibrina sau agregatele din suspensie care ar putea sa genereze rezultate fals pozitive.

8. PROTOCOLUL DE TESTARE

Se recomanda respectarea cu strictete a protocolului indicat.

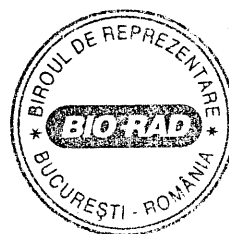
Utilizati martorii pozitivi si negative in fiecare microplaca pentru a valida calitatea detectiei in cazul unui test calitativ. Daca se doreste cuantificarea, martorul negativ si Standardele de cuantificare trebuie aplicate in fiecare placa. In ambele situatii este indicata respectarea configuratiei placii recomandata in trusa.

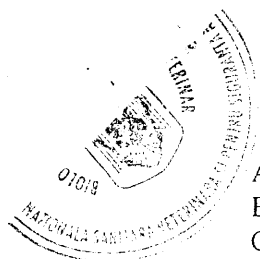
Se recomanda respectarea bunelor practici de laborator.

1. Extrageti din ambalajul protector suportul pentru microplaca si numarul necesar de barete (R1). Puneti baretele nefolosite si pachetul cu substanta deshidratanta inapoi in ambalaj si inchideti-l ermetic.
2. Stabiliti cu atentie distribuirea si identificarea probelor in placa, dupa cum urmeaza:

Configuratia microplacii pentru testul calitativ

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3	E3										
B	R3	E4										
C	R4a	E5										
D	R4a	E6										
E	R4b	E7										
F	R4b	E8										
G	E1	E9										
H	E2	E10..										





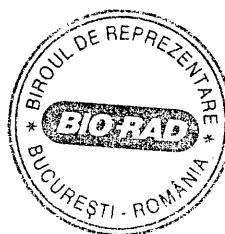
Configuratia microplacii pentru testul cantitativ:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3	S4	E1	E9								
B	R3	S4	E2	E10..								
C	R4a/OIE	S3	E3									
D	R4a/OIE	S3	E4									
E	S6	S2	E5									
F	S6	S2	E6									
G	S5	S1	E7									
H	S5	S1	E8									

3. Diluați marorii R3, R4a și R4b și serurile sau plasma de testat 1/100 în reactiv R6 (de ex.: 10 μl proba în 990 μl soluție de diluant).
 4. Pregătiți Standardele de Cuantificare (a se vedea capitolul 5), în cazul în care se realizează un test cantitativ.
 5. Distribuți 100 μl de probe diluate, mării și Standarde de Cuantificare în godeurile corespunzătoare ale microplacii, conform configurației prestabilite.
 6. Acoperiți microplaca cu folie adezivă (taiati foliile dacă este necesar). Presați puternic pe toată suprafața plăcii pentru a asigura sigilarea ermetică.
 7. Incubați barețele la $37 \pm 2^\circ\text{C}$ timp de 60 minute $\pm$ 5 minute.
 8. Pregătiți soluția de spălare (R2) [a se vedea capitolul 5]
 9. Pregătiți soluția de conjugat (R7), după cum este descris în capitolul 5, înainte de sfârșitul primei perioade de incubare.
 10. Înlăturați folia adezivă. Efectuați 3 cicluri de spălare. Condițiile optime de spălare se intrunesc atunci când se utilizează spălatoarele de microplaci Bio-Rad, de tip PW40, PW41 sau 1575, cu programul TSE 3. Nu lăsați microplacile să stea mai mult de 5 minute după ultimul ciclu de spălare. Uscăți placa prin rasturnare pe hartie absorbantă înainte de a trece la etapa următoare.
 11. Distribuți 100 μl soluție de conjugat (R7) în fiecare godeu. Acoperiți placa cu o folie adezivă nouă și incubați timp de 60 minute $\pm$ 5 minute la $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
 12. Pregătiți soluția de dezvoltare enzimatică (R8+R9) după cum este descris în capitolul 5, chiar înainte de utilizare.
 13. Înlăturați folia adezivă, efectuați 5 cicluri de spălare. Condițiile optime de spălare se obțin folosind spălatoarele de plăci Bio-Rad PW40, PW41 sau 1575 cu programul TSE 5. Nu lăsați microplaca să stea mai mult de 5 minute după ultimul ciclu de spălare. Uscăți placa prin rasturnare pe hartie absorbantă înainte de a trece la etapa următoare.
 14. Departe de lumina directă distribuți rapid 100 μl soluție de dezvoltare enzimatică (R8 + R9) în fiecare godeu și incubați placa la întuneric, la temperatura camerei (+18 până la +30°C) timp de 30 minute $\pm$ 5 minute.
- NB: Nu utilizați folie adezivă în timpul acestei etape de incubare.
15. Adăugați 100 μl soluție de stopare (R10) în fiecare godeu, respectând aceeași secvență și aceeași rată de distribuție ca în cazul soluției de revelare.



16. Stergeți cu atenție fundul microplacii. Citiți densitatea optică la 450 nm – 620 nm (modul de citire la dubla lungime de undă) în interval de 30 minute după stoparea reacției (barețele trebuie să fie întotdeauna protejate de lumină înainte de a efectua citirea).
17. Înainte de a înregistra rezultatele verificați dacă citirile corespund planului de distribuție și identificare a plăcii și probelor (configurația plăcii).



Parametrii spalatorului de microplaci

NUME: TSE 3

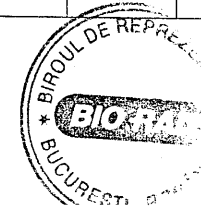
EDIT Mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CROS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	Nr OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	Nr OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575)	1*8 (PW40/1575) 2*8 (PW41)	1,2,3,4, 5,6,7,8,9, 10,11,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Method 1	-	-	-	WASH	Plate	Yes	0.3	800	2.5	W1	0	-	-	-	-	3	30 (PW41) 45 (PW40/1575)	0	-	-
Method 2	-	-	-	BOTTOM ASP.	Plate	Yes	0.3	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0	-	-	-

NUME: TSE 5

EDIT Mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CROS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	Nr OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	Nr OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575)	1*8 (PW40/1575) 2*8 (PW41)	1,2,3,4, 5,6,7,8,9, 10,11,12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-
Method 1	-	-	-	WASH	Plate	Yes	0.3	800	2.5	W1	0	-	-	-	-	5	30 (PW41) 45 (PW40/1575)	0	-	-
Method 2	-	-	-	BOTTOM ASP.	Plate	Yes	0.3	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0	-	-	-

NUME PLACA: FLAT 01 (PW40/PW41) – FLAT 03 (1575)

BOT. SHAPE	ASP. HOR. POS.	CENTERING	ASP. VER. POS.	BOT VERT. POS.	B.W. VERT. POS.	HORIZONTAL SPEED	VERTICAL SPEED	ASP. DOWNW. SPEED	DISP. UPW. SPEED	BOT. DOWNW. SPEED	BOT. UPWARD SPEED	SHAKING AMPLITUDE	SHAKING SPEED
Flat	1,4	0,3	13,5	9,5	9,5	6	8	6	9	6	9	1	9



9. CALCULAREA SI INTERPRETAREA REZULTATELOR

Rezultatele sunt redactate ca Densitati Optice (DO) dupa citirea microplacii la 450 - 620 nm.

1. Determinare calitativa

Pentru determinarea calitativa trebuie inclusi toti martorii (R3, R4a si R4b) pentru fiecare runda de testare.

a) Conditii de validare

Criteria

Validare

Absorbanta individuala a fiecarui martor negativ trebuie sa fie mai mica decat 0.05.

$$DO\ R3(i) < 0.05$$

Testul trebuie repetat daca cel putin una dintre valorile obtinute se situeaza in afara acestei limite.

Fiecare valoare individuala a DO corespunzatoare martorului pozitiv R4a trebuie sa se incadreze intre 0.300 si 1.200 .

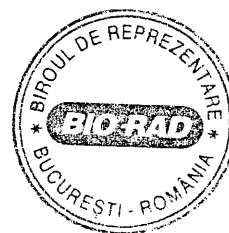
$$0.300 \leq DO\ R4a(i) \leq 1.200$$

Testul trebuie repetat daca cel putin una dintre valorile OD corespunzatoare lui R4a se situeaza in afara acestei limite.

Fiecare valoare individuala a densitatilor optice corespunzatoare martorului pozitiv R4b trebuie sa se incadreze intre 1.500 si 3.500. Totusi, cel mult o valoare individuala neconcordanata poate fi eliminata, in cazul in care densitatea sa optica este mai mica decat 1.500 sau mai mare decat 3.500.

$$1.500 \leq DO\ R4b(i) \leq 3.500$$

Testul trebuie repetat daca doua dintre valorile DO corespunzatoare martorului pozitiv R4b se situeaza in afara acestei limite.





b) Interpretarea rezultatelor

Valoarea Prag este egala cu media celor doi Martori Pozitivi R4a (DO R4a) si corespunde valorii prag de protectie la valoarea de 0,5 EU/ml.

Valoarea de Protectie Ridicata este egala cu media celor doi Martori Pozitivi R4b (DO R4b).

Densitatea Optica pentru fiecare proba este comparata cu aceasta Valoare de Protectie Ridicata si cu Valoarea Prag.

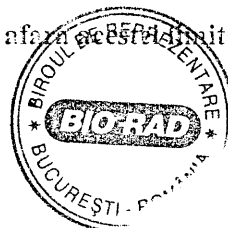
Criterii	Rezultat	Validare
Protectie +++	DO proba > <u>DO R4b</u>	Probele cu valoarea DO mai mare decat Valoarea de Protectie Ridicata provin de la indivizi cu un nivel inalt de protectie fata de infectia cu virusul rabic, conform testului PLATELIA RABIES II.
Protectie	<u>DO R4a</u> ≤ DO proba ≤ <u>DO R4b</u>	Probele cu valoarea DO mai mare sau egala cu Valoarea Prag si mai mica sau egala cu valoarea de Protectie Ridicata provin de la indivizi protejati fata de infectia cu virusul rabic, conform testului PLATELIA RABIES II.
Protectie absenta	DO proba < <u>DO R4a</u>	Probele cu valoarea DO mai mica decat Valoarea Prag provin de la indivizi care prezinta un nivel de anticorpi anti-rabici insuficient pentru a le asigura protectia fata de infectia cu virusul rabic conform expertilor OMS si OIE si conform testului PLATELIA RABIES II.

2. Determinarea cantitativa

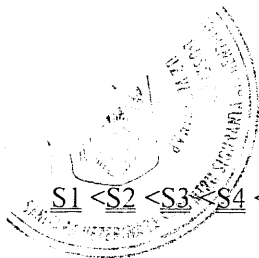
Pentru determinarea cantitativa, fiecare runda de testare trebuie sa includa toate standardele si toti martorii (S1 pana la S6, R3 si R4a).

a) Conditii de validare

Criterii	Validare
DO R3(i) < 0.05	Absorbanta individuala a fiecarui martor negativ trebuie sa fie mai mica decat 0.05. Testul trebuie repetat daca cel putin una dintre valori se situeaza in afara limitei.
$0.300 \leq DO R4a(i) \leq 1.200$	Fiecare valoare individuala a densitatilor optice corespunzatoare martorului pozitiv R4a trebuie sa se situeze intre 0.300 si 1.200 . Testul trebuie repetat daca cel putin una dintre valorile DO corespunzatoare lui R4a se situeaza in afara acestei limite.



Handwritten signature



Calculati valoarea medie a DO pentru S1 pana la S6 in urmatoarul mod:

S1 = media a doua valori OD pentru S1 (corespunde la 0.125 EU/ml)

S1 < S2 < S3 < S4 < S5 < S6 S2 = media a doua valori OD pentru S2 (corespunde la 0.25 EU/ml) etc...

Semnalele standardelor trebuie sa creasca in mainiera urmatoare:

S1 < S2 < S3 < S4 < S5 < S6

$$0.7 \leq \frac{S3}{R4a} DO \leq 1.3$$

Raportul dintre S3 (valoarea medie a standardului S3) si R4a (media R4a) trebuie sa se situeze intre 0.7 si 1.3

b) Interpretarea rezultatelor

Valoarea Prag este egala cu media celor doua valori OD ale Standardului de Cuantificare S3 (S3). Standardul de Cuantificare S3 corespunde valorii prag de protectie de 0.5 EU/ml.

Cantitatea de anticorpi anti-rabie din proba provenita de la om sau de la animal este determinata prin compararea dintre densitatea optica a probei si curba standard.

Titrurile serurilor sunt exprimate ca Unitati Echivalente la 1ml (EU/ml), unitate echivalenta cu unitatile internationale definite prin seroneutralizare.

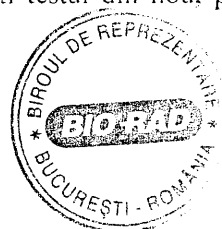
Trasarea curbei standard :

Pentru reducerea manuala a datelor folositi hartie milimetrica si reprezentati grafic valorile medii ale citirilor DO corespunzatoare Standardelor de Cuantificare (S1 la S6) pe axa verticala (y). Proiectati concentratiile corespunzatoare in EU/ml pe axa orizontala (x). Trasati curba standard prin cele 6 puncte.

Pentru reducerea automata a datelor cea mai uniforma interpolare se obtine utilizand o functie spline, pentru a construi curba bazata pe citirile valorilor DO corespunzatoare standardelor.

Poate fi furnizat un rezultat cantitativ pentru titrul anticorpilor anti-rabie in cazul unei probe necunoscute daca valoarea DO a probei se situeaza intre valorile medii ale densitatilor optice pentru S1 (0,125 EU/ml) si S6 (4 EU/ml). In acest caz, titrul probei necunoscute este determinat pe baza Curbei Standard. Gasiti valoarea corespunzatoare valorii DO a probei pe axa x si trasati o linie orizontala pana la Curba Standard. La punctul de intersectie cu Curba Standard coborati o linie verticala la axa x. Cititi valoarea corespunzatoare a concentratiei anticorpilor in EU/ml.

Daca valoarea DO a probei necunoscute este mai mare decat valoarea medie a Densitatii Optice pentru standardul S6, in acest caz nu se poate realiza o cunatificare precisa. Daca se doreste o cuantificare precisa, realizati o dilutie de cel putin 1/10 a probei si efectuati testul din nou, pentru a obtine o Densitate Optica incadrata in intervalul Curbei Standard.



Explicatii generale asupra rezultatelor :

Resultate exprimate ca	Titrul probei necunoscute (X)	Interpretarea rezultatelor
Densitati Optice pentru probe necunoscute		
DO proba > <u>S6</u>	X > 4 EU/ ml	Nivel ridicat de seroconversie (animal protejat). Daca este necesar un titru precis, proba trebuie diluata inainte de repetarea testului.
<u>S3</u> ≤ DO proba ≤ <u>S6</u>	X in EU/ml (0,5 – 4 EU/ml)	Nivel seroconversie suficient (animal protejat).
<u>S1</u> ≤ DO proba < <u>S3</u>	X in EU/ml (0,125-0,5 EU/ml)	Nivel insuficient seroconversie conform testului PLATELIA RABIES II (animal neprotejat).
DO proba < <u>S1</u>	-	Seroconversie nedetectabila (animal neprotejat).

10. ECHIPAMENTE SI MATERIALE NECESARE DAR CARE NU SUNT FURNIZATE IN TRUSA

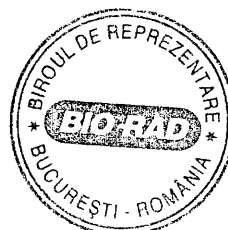
Echipamente

- ♦ Cititor de placi prevazut cu filtre de 450 si 620 nm (*)
- ♦ Incubator de microplaci programat la 37°C ± 2°C.
- ♦ Spalator de microplaci manual, semi-automat sau automat (*)
- ♦ Agitator tip Vortex

(*) Contactati Bio-Rad, Reprezentanta pentru Romania pentru informatii detaliate referitoare la instrumentele Bio-Rad validate de departamentul nostru tehnic.

Materiale

- ♦ Pipete automate sau semi-automate, ajustabile sau fixe pentru masurarea si distribuirea unor volume de 10 - 1000 µl si 1, 2 si 10 ml.
- ♦ Cilindri gradati de 25 ml, 50 ml, 100 ml, si 1 000 ml
- ♦ Eprubete de unica folosinta.
- ♦ Apa distilata sau deionizata
- ♦ Hipoclorit de sodiu
- ♦ Hartie absorbanta
- ♦ Masti si ochelari de protectie
- ♦ Manusi de unica folosinta din latex
- ♦ Container pentru reziduuri cu risc biologic





11. MASURI DE PRECAUTIE

1. Masuri de precautie

Calitatea rezultatelor depinde de aplicarea corecta a urmatoarelor bune practici de laborator:

- ♦ Reactivii trebuie pastrati la o temperatura intre $+2^{\circ}\text{C}$ si $+8^{\circ}\text{C}$
- ♦ Nu folositi reactivi expirati.
- ♦ Nu combinati reactivi din loturi diferite in cadrul unei runde de testare, cu exceptia reactivilor de uz general R2, R8, R9, R10.
- ♦ Inainte de utilizare asteptati 30 minute pana cand reactivii ajung la temperatura camerei.
- ♦ Reconstituiti reactivii cu atentie, evitand orice contaminare.
- ♦ Nu efectuati testul in prezenta vaporilor inflamabili (acizi, alkali, aldehide) sau a prafului care ar putea altera activitatea enzimei din cadrul conjugatului.
- ♦ Utilizati sticlariie spalata cu atentie si clatita cu apa deionizata sau preferabil, consumabile de unica folosinta.
- ♦ Nu lasati microplaca sa stea mai mult de 5 minute intre sfarsitul etapei de spalare si distribuirea reactivilor in placa.
- ♦ Verificati precizia pipetarii si buna functionare a aparatului utilizat.
- ♦ Nu folositi niciodata acelasi recipient pentru distribuirea conjugatului si a solutiei de dezvoltare.
- ♦ Reactia enzimatica este foarte sensibila la prezenta metalelor sau a ionilor metalici. In consecinta, nu lasati un element metalic sa vina in contact cu solutiile de conjugat sau de substrat.
- ♦ Solutia de dezvoltare (tampon substrat + cromogen) trebuie sa fie incolora. Aparitia unei culori albastre in cateva minute de la reconstituirea solutiei de dezvoltare indica faptul ca reactivul nu poate fi utilizat si trebuie inlocuit. Prepararea acestei solutii se poate face intr-o tavita curata de plastic, de unica folosinta sau intr-un recipient de sticla care a fost spalat in prealabil cu HCl 1N, si clatit cu atentie cu apa distilata si apoi uscat. Solutia trebuie tinuta la intuneric.
- ♦ Utilizati un varf nou de pipeta pentru fiecare proba.
- ♦ Nu modificati procedura de testare.
- ♦ Spalarea godeurilor reprezinta o etapa cruciala in cadrul metodei: respectati numarul de cicluri de spalare recomandat si asigurati-va de faptul ca godeurile sunt complet umplute, iar apoi golite. Spalarea neadecvata poate genera rezultate incorecte.

2. Instructiuni de igiena si siguranta

In general, conditiile de igiena, masurile de biosecuritate si bunele practici de laborator trebuie sa fie in concordanta cu reglementarile autoritatilor nationale.

Toti reactivii din trusa sunt destinati diagnosticului veterinar in laborator pentru testarea animalelor de caine, pisica si vulpe.



- ♦ Purtați manusi de unica folosinta atunci cand manipulati reactivii si probele. Spalati-va mainile riguros dupa ce manevrati probe si reactivi.
- ♦ Nu pipetati cu gura.
- ♦ Considerati orice material aflat in contact direct cu probele si reactivii, precum si solutiile de spalare drept material infectios.
- ♦ Evitati varsarea probelor sau a solutiilor care contin probe.
- ♦ Stropirile accidentale pot fi clatite cu solutie de hipoclorit diluat 10%. Daca lichidul contaminant este acid, zona stropita trebuie intai neutralizata cu bicarbonat de sodiu, apoi curatata cu hipoclorit si uscata cu hartie absorbanta. Materialul folosit pentru curatare trebuie inlaturat dupa decontaminare.
- ♦ Probele si materialele si produsele contaminate ar trebui sa fie eliminate dupa decontaminare.
 - Fie prin imersie in hipoclorit la o concentratie finala de 5% of hipoclorit de sodiu, timp de 30 min.
 - Fie prin autoclavare la 121°C timp de cel putin 2 ore.

Atentie: Nu introduceti solutii care contin hipoclorit de sodium in autoclav.

- ♦ Substantele chimice trebuie manipulate si eliminate in conformitate cu Bunele Practici de Laborator.
- ♦ Reactivii care contin ProClinTM 300 0.1% sunt clasificati ca preparate iritante conform legislatiei europene.



Xi
(0,1% ProClinTM 300)

R: 43 Poate provoca sensibilizare la contactul cu pielea.
S: 28-37 Dupa contactul accidental cu pielea se recomanda spalarea cu apa din abundenta. Se recomanda purtarea manusilor de protectie.

Verificat,
Chimist Fatu Luminita,
L. Fatu



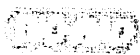
[Handwritten signature]

PLATELIATM RABIES II R4a

Control pozitiv (câine) 0,6 ml
0.5 EU/ml

50000

+8°C

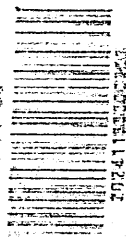


+7°C

5180E

LOT 300133

2005-09-30



2024113300223

PLATELIATM RABIES II R4b

Control pozitiv (câine) 0,6 ml
4 EU/ml

50000

+8°C

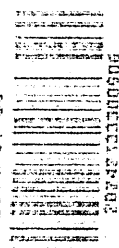


+7°C

5180E

LOT 300133

2005-09-30



2024113300223

PLATELIATM RABIES II R6

Diluant de probe 125 ml

IVD LOT 700001

2006-04-12



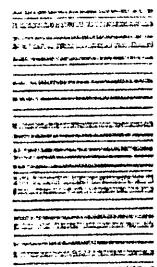
+7°C

+8°C

5180E

F-92470 Virus la Coquelic

51



20106001120485



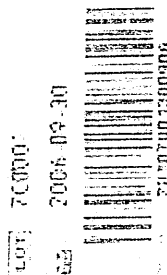
Handwritten signature

Handwritten text: 27.05.2006



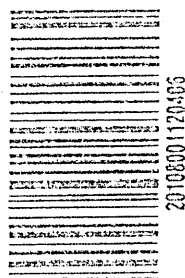
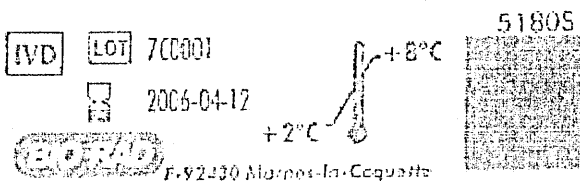
PLATELIA™ RABIES R7

Conjugat (10 x) 3ml



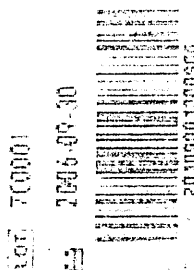
PLATELIA™ RABIES R8

Tampon substrat pentru peroxidază
(0,015% H₂O₂, 4% DMSO) 60 ml



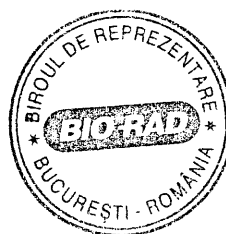
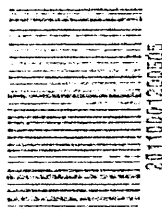
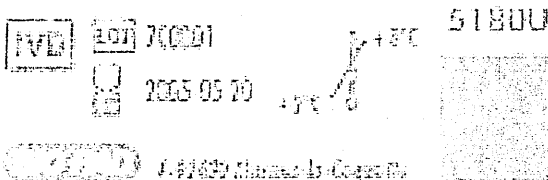
Cromogen (TIMB) R9

5 ml



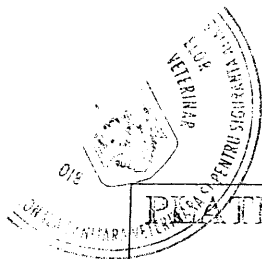
Soluție de stopare (H₂SO₄ 1N) R10

28 ml



Handwritten signature

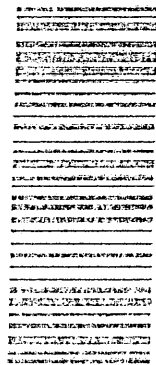
Handwritten signature



PLATELIATM RABIES II R1

Barete de 8 godeuri sensibilizate cu glicoproteina virusului rabic X 12

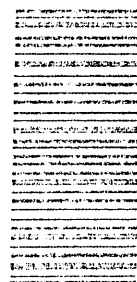
IVD LOT 700001 5180A
2005-04-12
+8°C
+7°C
F-92430 Marnes-Jo-Coquelle



20101001120405

Soluție de spălare concentrată 250 ml (10x)

IVD LOT 700001 5180R
2005-04-12
+25°C
+2°C
F-92430 Marnes-Jo-Coquelle

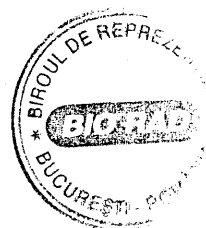
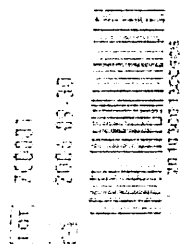


20102001120406

PLATELIATM RABIES II R3

Control negativ 0.6 ml

IVD LOT 700001 5180R
2005-04-12
+5°C
+2°C
F-92430 Marnes-Jo-Coquelle



[Handwritten signature]

[Handwritten signature]

PLATELIA TM RABIES II KIT

Pentru uz veterinar

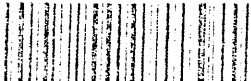
355 0180

R1 LOT 4J0007 2005-03-30



20101002300305

R2 LOT 4K0015 2005-04-15



20102015150405

R3 LOT 4J0001 2005-09-17



20103001170505

R4 LOT 7A0010 2005-06-17



20241010170505

R4b LOT 7A0011 2005-12-18



20242011181205

R6 LOT 4J0001 2005-08-15



20105001150805

R7 LOT 4I0007 2005-03-19



20107002150305

R8 LOT 4G0260 2005-03-27



20108260220305

R9 LOT 4F0188 2005-11-25



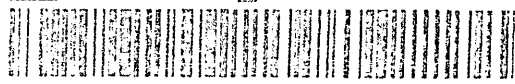
20109188251105

R10 LOT 4X0220 2005-12-15

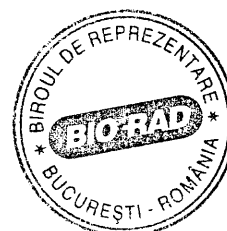


20110220151205

LOT 5A0002 2005-10-20

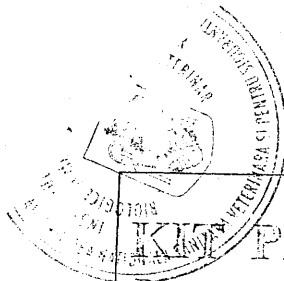


P50130175A0002



[Handwritten signature]

[Handwritten signature]



IKM PLATELIA™ RABIES II

355 0130

Pentru uz veterinar

Detectia și titrarea imunoglobulinei G. anti-virusului rabic în serul animal

192 Teste

R1	Microplacă	2 x 1
R2	Soluție de spălare concentrată (10x)	1 x 250 ml
R3	Control negativ	1 x 0,6 ml
R4a	Control pozitiv (câine) 0,5 EU/ml	1 x 0,6 ml
R4b	Control pozitiv (câine) 4 EU/ml	1 x 0,6 ml
R6	Diluant de probe	2 x 125 ml
R7	Conjugat concentrat (10x)	1 x 3 ml
R8	Tampón substrat pentru peroxidază	1 x 60 ml
R9	Cromogen (TMB)	1 x 5 ml
R10	Soluție de stopare	1 x 23 ml



X
R: 45
S: 28.37
0.1% PicoClor * 300



+2°C / +8°C



[Handwritten signature]

Verificat,
Chirist Fata Luncuile
Litu