

PLATELIA™ RABIES II KIT

Ad Usum Veterinarium

Σ 192

REF 3550180

KIT PENTRU DETECTIA SI TITRAREA IN VITRO A IgG ANTI GLICOPROTEINA VIRUSULUI RABIC IN SERUL PROVENIT DE LA CAINI, PISICI SI VULPI.

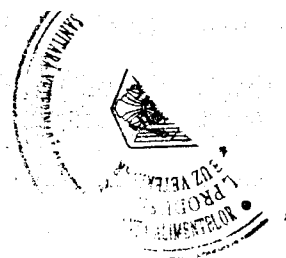
Toti reactivii produsii si comercializati sunt supusi unui sistem complet de control al calitatii, incepand cu receptia materialelor brute si pana la comercializarea finala a produsului. Fiecare lot este supus unui control de calitate si este eliberat spre vanzare numai daca este in conformitate cu criteriile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



881180-2015/06

BIO-RAD





CUPRINS

- 1 - DOMENIUL DE UTILZARE AL TRUSEI
- 2 - INTERESUL ASUPRA TRUSEI PLATELIA™ RABIES II
- 3 - PRINCIPIUL TESTULUI PLATELIA™ RABIES II
- 4 - COMPOZITIA TRUSEI PLATELIA™ RABIES II
- 5 - PREPARAREA SOLUTIILOR DE REACTIVI
- 6 - CONDITII DE STOCARE - VALABILITATE
- 7 - PROBE
- 8 - PROTOCOLUL DE TESTARE
- 9 - CALCULAREA SI INTERPRETAREA REZULTATELOR
- 10 - LIMITELE TESTULUI
- 11 - ECHIIPMENTE SI MATERIALE NECESARE DAR NEFURNIZATE IN TRUSA
- 12 - MASURI DE PRECAUTIE
- 13 - BIBLIOGRAFIE

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 serul de animale (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 mai multe 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:

- ♦ Serologia individuala in vederea comertului international: anticorpii 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 ca nivel acceptabil de seroconversie, de la care vaccinarea este considerata ca reusita.
- ♦ Confirmarea statusului de vaccinare in cursul unei campanii de vaccinare: controlul anticorpilor anti-rabie permite evaluarea indirecta a eficientei vaccinarii orale in cazul 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 unele specii de animale – caine, pisica si vulpe.

Acest test se bazeaza pe utilizarea unei tehnici imunoenzimaticice 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 standard OIE permit determinarea calitativa sau cantitativa a titrului anticorpilor anti-rabie in ser.

Implementarea testului cuprinde urmatoarele etape de reactie:

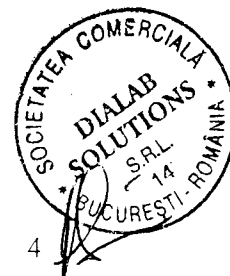
- 1) Serurile de testat, precum si Martorii Pozitivi calibrati sau Standardele de Cuantificare sunt distribuite in godeurile invelite cu glicoproteina ale microplacilor din trusa. In timpul etapei de incubare de o ora la 37°C, anticorpii anti-rabie prezenti in probe se leaga



godeurile invelite cu glicoproteina ale microplacii. Dupa incubare, anticorpii 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, proteina A marcata 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 450 nm, 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 - 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 – COMPOZIȚIA TRUSEI PLATELIA™ RABIES II

Toti reactivii sunt destinați exclusiv diagnosticului veterinar *in vitro*.

Trusa conține o cantitate de reactivi suficientă pentru 2 x 96 teste. Pe fiecare placă pot fi analizate 90 probe în cazul în care se realizează o determinare calitativă. Dacă se dorește un sistem cantitativ, până 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	Soluție de spălare: tampon Tris-NaCl, 10x Conservant : Proclin™300 (0,01%)	1 flacon (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 conținând BSA și ser de câine cu IgG anti-rabie Culoare galbenă. Conservant: Proclin™300 (0,1%)	1 flacon (0.6 ml)
R4b	Martor Pozitiv 4 EU/ml: martor pozitiv calibrat 4 EU/ml Tampon glicina conținând BSA și ser de câine cu IgG anti-rabie Culoare albastră. Conservant: Proclin™300 (0,1%)	1 flacon (0.6 ml)
R6	Diluant pentru proba: Tampon TRIS - EDTA gata de utilizare pentru diluarea probei. Culoare roșie. Conservant: Proclin™300 (0,1%)	2 flacoane (2 x 125 ml)
R7	Conjugat: Soluție conținând Proteina A – Peroxidaza și proteina bovină purificată. Soluție de 10x concentrată. Culoare verde. Conservant: Proclin™300 (0,1%)	1 flacon (3 ml)
R8	Tampon substrat pentru peroxidaza: Soluție de acid citric și acetat de sodiu conținând 0,015% H ₂ O ₂ și 4% dimetilsulfoxid (DMSO)	1 flacon (60 ml)
R9	Cromogen: soluție 0.25% tetrametilbenzidina (TMB)	1 flacon (5 ml)
R10	Soluție de Stopare: soluție acid sulfuric 1N	1 flacon (28 ml)
	Folie adezive pentru microplaci	6



5 – PREPARAREA REACTIVILOR

Nota:

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

Omogenizati reactivii prin agitare usoara inainte de deschiderea flacoanelor.

1. Reactivi gata de utilizare

♦ **Microplaci (R1)**

Inainte de deschiderea ambalajului impachetat sub vid, 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 imediat introduse in pachet, iar pachetul se va sigila dupa eliminarea aerului, apoi se va stoca 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 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)**

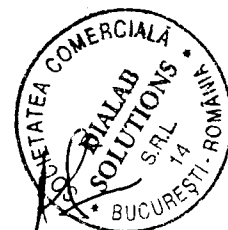
Diluati martorul pozitiv R4b 1/100 in R6

♦ **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 includa 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).

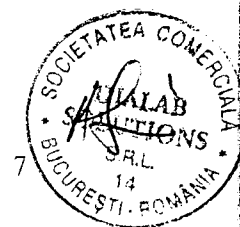
Standarde de Cuantificare		Concentratii obtinute prin dilutii seriale ale Martorului Pozitiv R4b
S6	Reactiv R4b diluat la 1/100	4 EU/ml
S5	S6 diluat la 1/2	2 EU/ml
S4	S5 diluat la 1/2	1 EU/ml
S3	S4 diluat la 1/2	0.5 EU/ml
S2	S3 diluat la 1/2	0.25 EU/ml
S1	S2 diluat la 1/2	0.125 EU/ml

6 – CONDITII DE STOCARE - VALABILITATE

Toate componentele trusei PLATELIA™ RABIES II kit se stocheaza la o temperatura 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 pana la +8°C
R2	Solutie de spalare diluata		2 saptamani la +2°C pana la +8°C
R7	Solutie de conjugat diluata	Se recomanda ca solutia diluata de conjugat sa fie utilizata imediat	8 ore la +2°C pana la +8°C
R8 + R9	Solutie de dezvoltare reconstituita		6 ore la temperatura camerei (+18°C pana la +30°C), intotdeauna la intuneric





7 - PROBE

- ◆ Testul PLATELIA™ RABIES II a test a fost dezvoltat pentru aplicarea sa in cazul serului de provenienta animala (caini, pisici si 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 negativ 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.

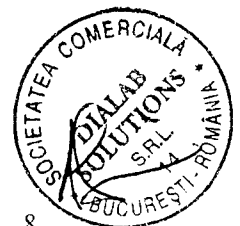
1. Extrageti din ambalajul protector suportul pentru microplaca si numarul necesar de barete (R1). Puneti baretele nefolosite si pachetul cu substanta deshidratanta inapoi in ambalaj si inchideti-l ermetic.
2. Stabiliti cu atentie distribuirea si identificarea probelor in placa, dupa cum urmeaza:

Configuratia microplacii pentru testul calitativ

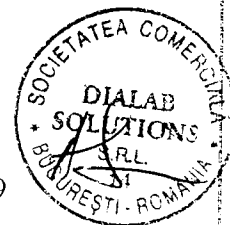
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	R3	E3										
B	R3	E4										
C	R4a	E5										
D	R4a	E6										
E	R4b	E7										
F	R4b	E8										
G	E1	E9										
H	E2	E10...										

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	S3	E3									
D	R4a	S3	E4									
E	S6	S2	E5									
F	S6	S2	E6									
G	S5	S1	E7									
H	S5	S1	E8									



3. Pentru testul calitativ diluati marorii R3, R4a si R4b si serurile de testat 1/100 in reactiv R6 (de ex.: 10 μ l proba in 990 μ l solutie de diluant).
4. Pentru testul cantitativ preparati Standardele de Cuantificare (a se vedea capitolul 5.3) si diluati marorii R3, R4a si serurile de testat 1/100 in reactiv R6 (de ex.: 10 μ l proba in 990 μ l solutie de diluant).
5. Distribuiti 100 μ l de probe diluate, martori si Standarde de Cuantificare in godeurile corespunzatoare ale microplacii, conform configuratiei prestabilite.
6. Acoperiti microplaca cu folie adeziva (taiati foliile daca este necesar). Presati puternic pe toata suprafata placii pentru a asigura sigilarea ermetica.
7. Incubati baretele la $37 \pm 2^\circ\text{C}$ timp de 60 minute \pm 5 minute.
8. Preparati solutia de spalare (R2) [a se vedea capitolul 5]
9. Preparati solutia de conjugat (R7), dupa cum este descris in capitolul 5, inainte de sfarsitul primei perioade de incubare.
10. Inlaturati folia adeziva. Efectuati 3 cicluri de spalare. Conditile optime de spalare se intrunesc atunci cand se utilizeaza spalatoarele de microplaci Bio-Rad, de tip PW40, PW41 sau 1575, cu programul TSE 3. Nu lasati microplacile sa stea mai mult de 5 minute dupa ultimul ciclu de spalare. Uscati placa prin rasturnare pe hartie absorbanta inainte de a trece la etapa urmatoare.
11. Distribuiti 100 μ l solutie de conjugat (R7) in fiecare godeu. Acoperiti placa cu o folie adeziva noua si incubati timp de 60 minute \pm 5 minute la $37 \pm 2^\circ\text{C}$.
12. Preparati solutia de developare enzimatica (R8+R9) dupa cum este descris in capitolul 5, chiar inainte de utilizare.
13. Inlaturati folia adeziva, efectuati 5 cicluri de spalare. Conditile optime de spalare se obtin folosind spalatoarele de placi Bio-Rad PW40, PW41 sau 1575 cu programul TSE 5. Nu lasati microplaca sa stea mai mult de 5 minute dupa ultimul ciclu de spalare. Uscati placa prin rasturnare pe hartie absorbanta inainte de a trece la etapa urmatoare.
14. Departe de lumina directa distribuiti rapid 100 μ l solutie de developare enzimatica (R8 + R9) in fiecare godeu si incubati placa la intuneric, la temperatura camerei (+18 pana la +30 $^\circ\text{C}$) timp de 30 minute \pm 5 minute.
NB: Nu utilizati folie adeziva in timpul acestei etape de incubare.
15. Aduagati 100 μ l solutie de stopare (R10) in fiecare godeu, respectand aceeasi secventa si aceeasi rata de distributie ca in cazul solutiei de revelare.
16. Stergeti cu atentie fundul microplacii. Cititi densitatea optica la 450 nm – 620 nm (Modul de citire la dubla lungime de unda) in interval de 30 minute dupa stoparea reactiei (baretele trebuie sa fie intotdeauna protejate de lumina inainte de a efectua citirea).
17. Inainte de a inregistra rezultatele verificati daca citirile corespund planului de distributie si identificare a placii si probelor (configuratie placii).



Parametrii spalatorului de microplaci

NUME: TSE 3

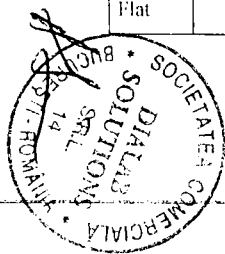
EDFT Mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CROS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	Nr OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	Nr OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575)	1*8 (PW40/1575) 2*8 (PW41)	1,2,3,4, 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

EDFT 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
$DO R3(i) < 0.05$	Absorbanta individuala a fiecarui martor negativ trebuie sa fie mai mica decat 0.05. Testul trebuie repetat daca cel putin una dintre valorile obtinute se situeaza in afara acestei limite.
$0.300 \leq DO R4a(i) \leq 1.200$	Fiecare valoare individuala a DO corespunzatoare martorului pozitiv R4a trebuie sa se incadreze intre 0.300 si 1.200 . Testul trebuie repetat daca cel putin una dintre valorile OD corespunzatoare lui R4a se situeaza in afara acestei limite.
$1.500 \leq DO R4b(i) \leq 3.500$	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 neconcordanta poate fi eliminata, in cazul in care densitatea sa optica este mai mica decat 1.500 sau mai mare decat 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 (S3) 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), sau cu a unui singur martor pozitiv daca a fost eliminata o valoare neconcordanta.

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

Status	Rezultat	Interpretare
Protectie +++	$DO\ proba > (DO\ R4b)$	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 virus rabic, conform testului PLATELIA™ RABIES II.
Protectie	$(DO\ R4a) \leq DO\ proba \leq (DO\ R4b)$	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 in urma vaccinarii, conform testului PLATELIA™ RABIES II.
Protectie absenta	$DO\ proba < (DO\ R4a)$	Probele cu valoarea DO mai mica decat Valoarea Prag provin de la indivizi care prezinta un nivel de anticorpi anti-rabici insuficient pentru a confirma eficienta vaccinarii conform testului PLATELIA™ RABIES II.

2. Determinarea cantitativa

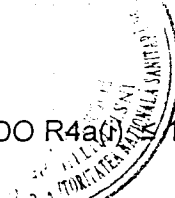
Pentru determinarea cantitativa, fiecare runda de testare trebuie sa includa toate standardele si toti martorii (S1 pana la S6, R3 si R4a).

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 ≤ DO R4a ≤ 1.200



Fiecare valoare individuala a densitatilor optice corespunzatoare matorului pozitiv R4a trebuie sa se situeze intre 0.300 si 1.200.

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

S1 < S2 < S3 < S4 < S5 < S6

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

$\overline{S1}$ = media a doua valori OD pentru S1 (corespunde la 0.125 EU/ml)

$\overline{S2}$ = media a doua valori OD pentru S2 (corespunde la 0.25 EU/ml) etc...

Semnalele standardelor trebuie s a creasca in mainiera urmatoare:

$\overline{S1} < \overline{S2} < \overline{S3} < \overline{S4} < \overline{S5} < \overline{S6}$

$0.7 \leq \overline{S3/R4a} \leq 1.3$

Raportul dintre $\overline{S3}$ (valoarea medie a standardului S3) si $\overline{R4a}$ (media R4a) trebuie sa se situeze intre 0.7 si 1.3

b) Interpretarea rezultatelor

Valoarea Prag este egala cu media celor doua valori DO ale Standardului de Cuantificare S3 ($\overline{DO R4a}$). Standardul de Cuantificare S3 corespunde valorii prag de protectie de 0.5 EU/ml.

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

Titururile 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 milimetrice 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



Standard coborati o linie verticala la axa x. Cititi valoarea corespunzatoare 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.

Nota: O interpretare si o modalitate de conversie a valorilor DO in titru de anticorpi se gasesc pe CD (RabiesQT-ELISA BIO-RAD – Vers.200712.A.XLS) pentru utilizatori care nu sunt echipati cu cititoare de microplaci Bio-Rad.

Explicatii generale asupra rezultatelor :

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

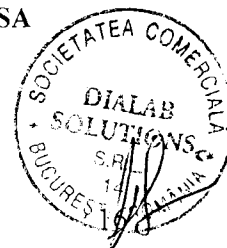
10 – LIMITELE TESTULUI

Un nivel de seroconversie insuficient sau nedetectabil poate fi raportat in cazul animalelor vaccinate recent, datorita unui raspuns imun intarziat. Similar metodei oficiale de titrare a anticorpilor neutralizanti, conform reglementarii (EC) Nr. 998 / 2003 valabila de la 3 iulie 2004, se recomanda efectuarea testului PLATELIA™ RABIES II in cazul probelor de ser prelevate cel mai curand la 30 zile dupa vaccinare.

11 – ECHIPAMENTE SI MATERIALE NECESARE DAR NEFURNIZATE IN TRUSA

Echiptamente

- Cititor de placi prevazut cu filtre de 450 si 620 nm (*)



- ◆ Incubator de microplaci programat la $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- ◆ Spalator de microplaci manual, semi-automat sau automat (*)
- ◆ Agitator tip Vortex

(*) Contactati un reprezentant Bio-Rad, 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.
- ◆ Cilindrii 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 sau ochelari de protectie
- ◆ Manusi de unica folosinta din latex
- ◆ Container pentru reziduuri cu risc biologic

12 – 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 sticlaria 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 incolore. 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 spalata in prealabil cu HCl 1N, si clatita cu atentie cu apa distilata si apoi uscata. 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

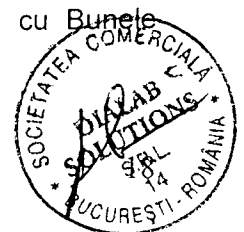
In general, conditiile de igiena, masurile de biosecuritate si bunele practici de laborator trebuie sa fie in concordanta cu reglementarile autoritatilor nationale.

Toti reactivii din trusa sunt destinati diagnosticului veterinar "in vitro" – pentru seruri de caine, pisica si vulpe.

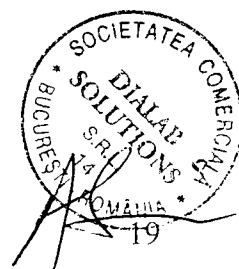
- ◆ Purtati manusi de unica folosinta atunci cand manipulati reactivii si probele. Spalati-va mainile riguros dupa ce manevrati probe si reactivi.
- ◆ Nu pipetati cu gura.
- ◆ Considerati orice material aflat in contact direct cu probele si reactivii, precum si solutiile de spalare drept material infectios.
- ◆ 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% 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 sodiu in autoclav.

- ◆ Substantele chimice trebuie manipulate si eliminate in conformitate cu Bunele Practici de Laborator.

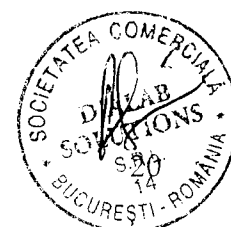
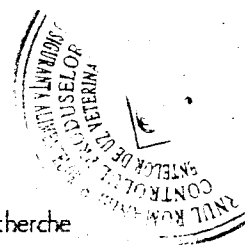


- ♦ Pentru recomandari de pericol si precautie legate de unele componente chimice din aceasta trusa va rugam sa consultati pictograma de pe etichete si informatiile furnizate la sfarsitul manualului de instructiuni. Fisa tehnica de securitate este disponibila pe www.bio-rad.com.

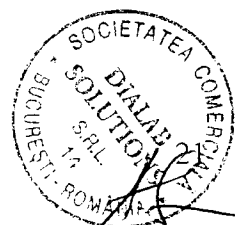


13 – BIBLIOGRAFIE

1. ATANASIU P., SAVY V. and PERRIN P. 1977. Epreuve immuno-enzymatique pour la recherche rapide des anticorps antirabiques. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol.* 128 A, 489-498.
2. ATANASIU P., SAVY V. and GIBERT C. 1978. Rapid immunoenzymatic technique for titration of rabies antibodies IgG and IgM results. *Med. Microbiol. Immunol.* 166, 201-208.
3. ATANASIU P. and PERRIN P. 1979. Microméthode immuno-enzymatique de titrage des anticorps antirabiques : utilisation de la glycoprotéine rabique et de la protéine A conjuguées à la peroxydase. *Ann. Inst. Pasteur Microbiol. A,* 257-268.
4. ATANASIU P., PERRIN P. and DELAGNEAU J.F. 1980. Use of an enzyme immunoassay with protein A for rabies antigen and antibody determination. *Develop. Biol. Standard.* 46, 207-215.
5. AVRAMEAS S. and TERNYNCK T. 1971. Peroxidase labelled antibody and Fab conjugates with enhanced intracellular penetration. *Immunochemistry* 8, 1175-1179.
6. BIDERFIELD P., GHETIE V. and SJOQUIST J. 1975. Demonstration and assaying of IgG antibodies in tissues and on cells by labelled staphylococcal protein A. *J. Immunol. Meth.* 6, 249-259.
7. BOURHY H., SUREAU P. 1989. Comparative field evaluation of the fluorescent antibody test, virus isolation from tissue culture, and enzymes immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies. *J. Clin. Microbiol.* 27, 519-523.
8. BRIGGS D.J., SMITH J.S., MUELLER F.L., SCHWENKE J., DAVIS R.D., GORDON C.R., SCHWEITZER K., ORCIARI L.A., YAGER P.A., RUPPRECHT C.E. 1998. A comparison of two serological methods for detecting the immune response after rabies vaccination in dogs and cats being exported to rabies-free areas. *Biologicals* 26, 347-355.
9. CLIQUET F., AUBERT M., SAGNE L. 1998. Development of a fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J. Immunol. Methods* 212, 79-87.
10. CLIQUET F., L. SAGNE, J.L. SCHEREFFER, M.F.A. AUBERT. 2000. ELISA test for rabies antibody titration in orally vaccinated foxes sampled in the fields. *Vaccine* 18, 3272-3279.
11. CLIQUET F., VERDIER Y., SAGNE L., AUBERT M., SCHEREFFER J.L., SELVE M., WASNIEWSKI M., SERVAT A. 2003. Neutralising antibody titration in 25,000 sera of dogs and cats vaccinated against rabies in France, in the framework of the new regulations that offer an alternative to quarantine. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 22 (3), 857-866.
12. CLIQUET F., MÜLLER T, MUTINELLI F., BROCHIER B., AUBERT M. and all. 2003. Standardisation and establishment of a rabies ELISA test in European laboratories for assessing the efficacy of oral fox vaccination campaigns. *Vaccine* 21, 2986-2993.
13. CLIQUET F, Mc ELHINNEY L.M., SERVAT A., BOUCHER J.M., LOWINGS J.P., GODDARD T., MANSFIELD K.L, FOOKS A.R. 2004. Development of a qualitative indirect ELISA for the measurement of rabies virus-specific antibodies from vaccinated dogs and cats. *J. Vir. Methods* 117, 1-8.



14. ENGVALL E. and PERLMANN P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871-874.
15. FEYSSAGUET M., DACHEUX L, AUDRY L, COMPOINT A., MORIZE JL , BLANCHARD I., BOURHY F. 2007. Multicenter comparative study of a new ELISA, PLATELIA™ RABIES II, for the detection and titration of anti-rabies glycoprotein antibodies and comparison with the rapid fluorescent focus inhibition test (RFFIT) on human samples from vaccinated and non-vaccinated people. *Vaccine* 25(12):2244-51
16. FORSGREN A. and SJOQUIST J. 1966. "Protein A" from *S. aureus*. I. Pseudo-immune reaction with human globulin. *J. Immunol.* 97, 822-827.
17. GRASSI M., WANDELER A.L, PETERHANS E. 1989. Enzyme-linked Immunosorbent Assay for Determination of the Envelope Glycoprotein of Rabies Virus. *J. Clin. Microbiol.* 27 (5), 899-902.
18. PERRIN P., VERSMISSE P., DELAGNEAU J.F., LUCAS G., ROLLIN P.E. and SUREAU P. 1986. The influence of the type of immunosorbent on rabies antibody EIA: advantages of purified glycoprotein over whole virus. *J. Biol. Standard.* 14, 95-102.
19. SERVAT A., CLIQUET F. 2006. Collaborative study to evaluate a new ELISA test to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic carnivores. *Virus Res.* 120, 17-27.
20. SERVAT A., FEYSSAGUET M., BLANCHARD I., BOUE F., CLIQUET F. 2007. A quantitative indirect ELISA to monitor the effectiveness of rabies vaccination in domestic and wild carnivores. *J Immunol Methods* 318(1-2):1-10
21. STANTIC-PAVUNIC M., HOSTNIK P., LEVICNIK-STEZINAR S., ZALETEL-KRAGEU L. 2006. Vaccination against rabies and protective antibodies : comparison of ELISA and fluorescent antibody virus neutralization (FAVN) assays. *Veterinarski Archiv* 76 (4), 281-289.
22. WRIGHT C., WILLIAM KJ., SJODAHL J., BURTON D.R. and DWEK R.A. 1977. The interaction of protein A and the Fc fragment of rabbit immunoglobulin G as probed by complement-fixation and nuclear magnetic resonance studies. *Bioch. J.* 167, 661-668.
23. Manual of standards for diagnostic tests and vaccines. OIE 2000. Chapters 1.1.3 and 2.2.



BIO-RAD

PLATELIA™ Rabies II

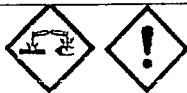
Cat# 3550180

ETICHETE**Etichete ambalaj secundar****PLATELIA™ RABIES II KIT** *Ad Usum Veterinarium***REF 35501**

DETECTAREA ȘI TITRAREA IGG ANTI-RABIE ÎN SER ANIMAL


1
 TEST IN VI

R1	2 x 1	Microplacă	R6	2 x 125 ml	Diluant probe
R2	1 x 250 ml	Soluție de spălare (10X)	R7	1 x 3 ml	Conjugat (10X)
R3	1 x 0,6 ml	Martor negativ	R8	1 x 60 ml	Tampon substrat peroxidază
R4a	1 x 0,6 ml	0,5 EU/ml Martor pozitiv	R9	1 x 5 ml	Cromogen (TMB)
R4b	1 x 0,6 ml	4 EU/ml Martor pozitiv	R10	1 x 28 ml	Soluție stopare
			6	Pelicule adezive	


**Pericol**

H314 – H317
 P280 – P305+P351+P338
 P301+P330+P331 – P302+P352 – P333+P313 – P501

Pentru informații cu privire la
 siguranță consultați Fișa cu Date de
 Securitate.

www.bio-rad.com
PLATELIA™ RABIES II KIT *Ad Usum Veterinarium***REF 3550180**

(01)03610520478448
 (17)160715
 (10)5A0010


LOT 5A0010  2016-07-15

R1	LOT	5A0010	R6	LOT	5A0010
R2	LOT	5A0010	R7	LOT	5A0010
R3	LOT	5A0010	R8	LOT	5A0010
R4a	LOT	5A0010	R9	LOT	5A0010
R4b	LOT	5A0010	R10	LOT	5A0010

BIO-RAD

PLATELIA™ Rabies II
Cat# 3550180

Etichete ambalaj primar


PLATELIA™ RABIES II R1

Barete învelite cu glicoproteina virus rabic X 12

IVD

LOT: 5A0010

2016-07-15



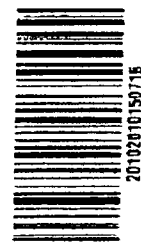
20101010150715

Bio-Rad – F 92430 Marnes la Coquette 00008

CONCENTRATED WASH SOLUTION R2

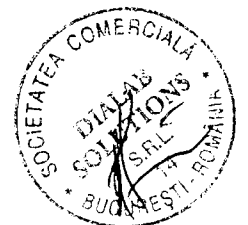
Soluție de spălare concentrată **10X** 250 ml

5A0010
2016-07-15



883212

F 92430 Marnes-la-Coquette



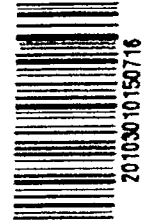
PLATELIA™ RABIES II R3

Martor negativ 0,6 ml



LOT 5A0010

2016-07-15



883217

PLATELIA™ RABIES II R4a

Martor pozitiv (câine) 0,6 ml
0,5 EU/ml



LOT 5A0010

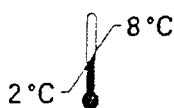
2016-07-15



883217

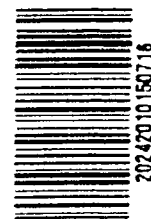
PLATELIA™ RABIES II R4b

Martor pozitiv (câine) 0,6 ml
4 EU/ml



LOT 5A0010

2016-07-15



883217



BIO-RAD

PLATELIA™ Rabies II
Cat# 3550180

PLATELIA™ RABIES II

R6

Diluant probă

125 ml

5A0010
2016-07-15



883219

F 92430 Marnes-la-Coquette

PLATELIA™ RABIES II

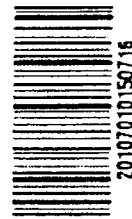
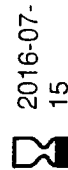
R7

Conjugat concentrat

3 ml
(10x)



LOT 5A0010



883217

SUBSTRATE BUFFER

R8

Tampon substrat **TMB buf.**

60 ml

5A0010
2016-07-15



883213

F 92430 Marnes-la-Coquette



PLATELIA™ Rabies II
Cat# 3550180

CROMOGEN: TMB SOLUTION **R9**

Cromogen: Soluție TMB **TMB sol.** **5 ml**

LOT 5A0010

2016-07-15

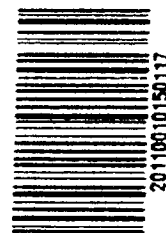


883236

STOP SOLUTION **R10**

Soluție de stopare **1N** **28 ml**

5A0010
2016-07-15



F 92430 Marnes-la-Coquette

883216