

PLATELIA RABIES II

Ad Usus Veterinarius

 192

REF 3550180

KIT FOR *IN VITRO* DETECTION AND TITRATION OF IgG ANTI RABIES VIRUS GLYCOPROTEIN IN DOGS, CATS AND FOXES SERUM.

All manufactured and commercialized reagents are under complete quality system starting from reception of raw materials to the final commercialization of the product.

Each lot is submitted to a quality control and released on the market when conforming to the acceptance criteria.



2023/10

BIO-RAD

TABLE OF CONTENTS

- 1 - INTENDED USE
- 2 - INTEREST OF PLATELIA RABIES II KIT
- 3 - PRINCIPLE OF THE PLATELIA RABIES II ASSAY
- 4 - COMPOSITION OF THE PLATELIA RABIES II KIT
- 5 - PREPARATION OF THE REAGENTS
- 6 - STORAGE - SHELF-LIFE
- 7 - SAMPLES
- 8 - ASSAY PROTOCOL
- 9 - CALCULATION AND INTERPRETATION OF THE RESULTS
- 10 - LIMITATIONS OF THE TEST
- 11 - EQUIPMENT AND MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED
- 12 - PRECAUTIONS
- 13 - LITERATURE

1 - INTENDED USE

The PLATELIA RABIES II is an *in vitro* diagnostic ELISA test allowing detection and titration of IgG anti rabies virus glycoprotein in animal (dogs, cats and foxes) serum.

2 - INTEREST OF THE PLATELIA RABIES II KIT

Rabies is one of the oldest viral diseases afflicting humans and animals. Rabies virus is a highly neurotropic virus, usually causing fatal encephalitis in mammals. The virus is mostly transmitted through the saliva via bites from rabid animals. Immunization and control programs for the protection of animal populations from rabies virus have resulted in the elimination of the disease in several Western-European countries and in some countries in South America.

As of July 3rd 2004, a new European regulation applies to international movements of domestic carnivores from rabies-infected to rabies-free countries. Domestic carnivores are allowed to travel if their serum contain at least 0.5 IU/ml (International Units/ml) of rabies neutralising antibodies.

Anti-rabies antibodies titration has several practical applications :

- Individual serology for international trade purposes: anti-rabies antibodies are measured in specialized laboratories in order to determine the degree of immunity of vaccinated animals (cats and dogs). A level of antibody equal to or superior to 0.5 IU/ml is considered by OIE experts as an acceptable seroconversion level above which the vaccination could be considered as successful.
- Confirmation of vaccinated status during a vaccination campaign: control of the anti-rabies antibodies enables indirect assessment of the effectiveness of oral vaccination campaign in wildlife (foxes).

3 - PRINCIPLE OF THE PLATELIA RABIES II ASSAY

PLATELIA RABIES II is an immuno-enzymatic technique for the detection of rabies virus anti-glycoprotein antibodies. This assay can be carried out on the serum of several species of animals - dog, cat and fox.

The test is based on the use of a solid phase enzyme immunoassay technique referred to as an indirect ELISA. A microplate is coated with rabies glycoprotein extracted from the inactivated and purified virus membrane. The enzymatic conjugate consists of a protein A from *Staphylococcus aureus* coupled with peroxidase. Positive controls, calibrated against OIE standard, allow the qualitative or quantitative determination of anti-rabies antibody titre in the serum.

Implementation of the test comprises the following reaction steps:

- 1 - The unknown sera as well as the calibrated Positive Controls or the Quantification Standards are distributed in the glycoprotein coated wells of the microplates. During incubation of one hour at 37°C, anti-rabies antibodies present in the sample bind to the glycoprotein coated to the microplate wells. After incubation, unbound antibodies and other serum proteins are removed by washings.
- 2 - The conjugate (protein A labelled with peroxidase) is added to the microplate wells. During a second incubation of one hour at 37°C, the labelled protein A binds to the anti-rabies-antibody-antigen complexes attached to the microplate wells. The unbound conjugate is removed by washings.

- 3 - The presence of immune complex is demonstrated by the addition of a solution containing a peroxidase substrate and a chromogen, initiating a colour development reaction.
- 4 - After 30 min. incubation at room temperature, the enzymatic reaction is stopped by addition of a solution H_2SO_4 1N. The optical density reading obtained with a spectrophotometer set at 450 - 620 nm is proportional to the amount of anti-rabies antibodies present in the samples. A standard curve is constructed using the Quantification standards (S1 to S6), obtained by serial dilutions of the R4b calibrated Positive Controls.

The optical density values for the unknown samples are compared with the Positive Controls. Sera titres in quantification tests are obtained after a direct reading on the standard curve and are expressed as Equivalent units per ml (EU/ml), unit equivalent to the international units defined by seroneutralization.

4 - COMPOSITION OF THE PLATELIA RABIES II KIT

All reagents are exclusively for *in vitro* veterinary use.

Enough reagents are provided for 2 x 96 assays. On each microplate, 90 samples can be analysed if a qualitative test is performed. Up to 80 samples can be quantified precisely for rabies antibodies if a quantification system is used.

LABELLING	TYPE OF REAGENT	PRESENTATION
R1	Microplate: 12 strips of 8 wells sensitized with the rabies virus glycoprotein	2 plates
R2	Wash solution: 10-fold concentrated Tris-NaCl buffer Preservative: ProClin™ 300 (0.01%)	1 vial (250 ml)
R3	Negative control: Non reactive control TRIS-EDTA Preservative: ProClin™ 300 (0.1%)	1 vial (0.6 ml)
R4a	0,5 EU/ml Positive control: 0.5 EU/ml calibrated positive control Glycine buffer containing BSA and dog serum with anti-rabies IgG. Yellow coloured. Preservative: ProClin™ 300 (0.1%)	1 vial (0.6 ml)
R4b	4 EU/ ml Positive control: 4 EU/ml calibrated positive control Glycine buffer containing BSA and dog serum with anti-rabies IgG. Blue coloured Preservative: ProClin™ 300 (0.1%)	1 vial (0.6 ml)
R6	Sample diluent: Ready-to use TRIS - EDTA buffer for sample dilution. Red coloured. Preservative: ProClin™ 300 (0.1%)	2 vials (2 x 125 ml)
R7	Conjugate: Solution containing Protein A-Peroxidase and purified bovine protein. Concentrated 10 times. Green coloured. Preservative: ProClin™ 300 (0.1%)	1 vial (3 ml)
R8	Peroxydase substrate buffer: Solution of citric acid and sodium acetate containing 0.015% H ₂ O ₂ and 4% dimethylsulfoxide (DMSO)	1 vial (60 ml)
R9	Chromogen: Tetramethylbenzidine (TMB) solution 0.25%	1 vial (5 ml)
R10	Stop solution: 1 N sulphuric acid solution	1 vial (28 ml)
	Adhesive films for microplates	6

5 - PREPARATION OF REAGENTS

Note:

Before use, allow reagents to reach room temperature (+18 to +30°C) for 30 minutes. Homogenize the reagents by gently mixing, before opening.

1 - Ready-to-use reagents

- **Microplates (R1)**

Prior to use, let the microplate adjust to room temperature (+18°C to +30°C) in its protective packaging to avoid any water condensation in the wells. Any unused strips should be immediately returned to the bag, tightly close the bag after expelling any air, then store at +2°C to +8°C.

- **Sample diluent (R6)**

- **Stop solution (R10)**

2 - Reagents to be reconstituted

- **Wash solution (R2)**

Dilute the solution 1/10 in distilled water (example 100 ml of reagent R2 in 900 ml of distilled water). 500 ml are required for a plate.

- **Negative control (R3)**

Dilute the solution 1/100 in R6.

- **0.5 EU/ml Positive control (R4a)**

Dilute the R4a positive control 1/100 in R6

- **4 EU/ml Positive control (R4b)**

Dilute the R4b positive control 1/100 in R6

- **Conjugate (R7)**

The solution is concentrated 10 times. To prepare diluted conjugate solution, add 1 volume of concentrated conjugate to 9 volumes of prepared 1X wash solution (R2). 11 ml is required for a full microplate.

- **Enzymatic development solution (R8 + R9)**

Dilute reagent R9 to 1/11 in the reagent R8 (example: 0.1 ml of reagent R9 in 1 ml of reagent R8) bearing in mind that 11 ml of enzymatic revelation solution is sufficient for 1 microplate. Homogenize gently. Avoid using a Vortex® agitator.

3 - Preparation of the Quantification Standards for a quantification assay

Each quantification assay using PLATELIA RABIES II should include 6 Quantification standards – from S1 to S6.

The calibrated R4b Positive control (4 EU/ml) corresponds to the S6 Quantification standard.

Serial dilutions out of the R4b reagent allow the preparation of S5 to S1 Quantification standards. The dilutions are performed using the sample diluent (reagent R6).

Quantification standards		Concentrations obtained by serial dilutions of the R4b Positive control
S6	R4b diluted to 1/100	4 EU/ml
S5	S6 diluted to 1/2	2 EU/ml
S4	S5 diluted to 1/2	1 EU/ml
S3	S4 diluted to 1/2	0.5 EU/ml
S2	S3 diluted to 1/2	0.25 EU/ml
S1	S2 diluted to 1/2	0.125 EU/ml

6 - STORAGE - SHELF LIFE

As supplied, all the components of the PLATELIA RABIES II are stored at +2°C to +8°C and can be used until the expiry date indicated on the kit. Reagent R2 (10 X) can be stored at +2°C to +25°C before reconstitution.

The shelf-lives of the reagents after preparation are as follow:

	REAGENT	REMARKS	SHELF-LIFE
R1	Microplate	After opening the sealed foil lined bag, the unused strips should immediately be put back in the bag and the bag again sealed. The desiccant should remain in the foil bag.	1 month at +2°C to +8°C
R2	Diluted wash solution		2 weeks at +2°C to +8°C
R7	Diluted conjugate solution	The diluted conjugate solution should preferably be used immediately	8 hours at +2°C to +8°C
R8 + R9	Reconstituted development solution		6 hours at room temperature (+18°C to +30°C) always protected from light

7 - SAMPLES

- The PLATELIA RABIES II test has been developed for application to animal (dogs, cats and foxes) serum.
- The assay is carried out on sera after a 1/100 dilution in R6 reagent.
- The samples are stored at +2°C to +8°C if the detection is carried out within 24 hours or can be stored at -20°C for 6 months. The samples can be submitted to 3 cycles of freezing and thawing. Previously frozen samples should be thoroughly mixed after thawing prior to testing.

NB: Eliminate, if necessary by centrifuging, the fibrin particles or aggregates in suspension that can provide false positive results.

8 - ASSAY PROTOCOL

Strictly follow the recommended protocol.

Use the negative and the positive controls for each test run and on each microplate in order to validate the quality of the detection in the qualitative assay. If quantification is performed, the negative control and the Quantification standards should be deposited on each plate. In both cases, follow the recommended microplate set-up.

Use good laboratory practices.

1. Remove the microplate rack and the required number of rows (R1) from the protective packaging. Replace the unused rows with the desiccated bag in the microplate sachet and hermetically close it.
2. Carefully establish the sample distribution and identification plan as follow:

Microplate set-up for Qualitative assay:												
	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...										

Microplate set-up for Quantitative assay:												
	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. For the qualitative assay, dilute the R3, R4a and R4b controls and the unknown sera to 1/100 in R6 reagent (e.g.: 10 µl of sample in 990 µl of dilution solution).
4. For the quantitative assay, prepare the quantification standards (refer to chapter 5.3) and dilute the R3, R4a controls and the unknown sera to 1/100 in R6 reagent (e.g. 10 µl of sample in 990 µl of dilution solution).
5. Distribute 100 µl of diluted samples, controls and Quantification standards in the correspondent microplate wells according to the pre-established distribution plan.
6. Cover the microplate with adhesive film (cut the sheet if necessary). Press firmly all over the plate to ensure a tight seal.
7. Incubate the strips at $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ for 60 minutes $\pm$ 5 minutes.
8. Prepare the wash solution (R2) [refer to chapter 5]
9. Prepare the conjugate solution (R7), as described in chapter 5 before the end of the first incubation.
10. Remove the adhesive film. Perform 3 wash cycles. Optimal washing conditions are obtained with PW40, PW41 or 1575 Bio-Rad plate washers with program TSE 3. Do not let the microplate stand for more than 5 minutes after the last wash cycle. Dry by inversion on absorbent paper before the following step.
11. Distribute 100 µl of the conjugate solution (R7) into each well. Cover with a new adhesive film and incubate for 60 minutes $\pm$ 5 minutes at $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
12. Prepare the enzymatic development solution (R8+R9) as described in chapter 5, just before use.
13. Remove the adhesive film, perform 5 wash cycles. Optimal washing conditions are obtained with PW40, PW41 or 1575 Bio-Rad plate washers with programs TSE 5. Do not let the microplate stand for more than 5 minutes after the last wash cycle. Dry by inversion on absorbent paper before the following step.
14. Away from direct light, quickly distribute 100 µl of the enzymatic development solution (R8 + R9) into each well and incubate the plate in darkness at room temperature (+18 to +30°C) for 30 minutes $\pm$ 5 minutes.
NB: Do not use adhesive film during this incubation.
15. Add 100 µl of the stop solution (R10) to each well according to the same sequence and same distribution rate as for the enzymatic development solution.
16. Thoroughly wipe the bottom of the plate. Read the optical density at 450 - 620 nm (Dual wavelength mode) within 30 minutes after stopping the reaction (the strips must always be protected from light before reading).
17. Before recording the results, check that the reading complies with the distribution and identification plan for the plates and samples.

MICROPLATE WASHER PARAMETERS

NAME: TSE 3

EDIT Mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CROSS/W/ ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	N° OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	N° OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575)	118 PW40/1575/28 (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	-	-	-

NAME: TSE 5

EDIT Mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CROSS/W/ ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	N° OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	N° OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575)	118 PW40/1575/28 (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	-	-	-

PLATE NAME: 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 - CALCULATION AND INTERPRETATION OF THE RESULTS

The results are given in Optical Densities (ODs) after reading of the microplate at 450 - 620 nm.

1. Qualitative determination

For the qualitative determination, include all the controls (R3, R4a and R4b) for each test run.

a) Conditions of validation

Criteria	Validation
$OD\ R3(i) < 0.05$	The absorbance of each individual negative control must be lower than 0.05. The test must be repeated if at least one value lies outside of this limit.
$0.300 \leq OD\ R4a(i) \leq 1.200$	Each individual value of the R4a positive control OD must be between 0.300 and 1.200. The test must be repeated if at least one of the R4a OD value lies outside of this limit.
$1.500 \leq OD\ R4b(i) \leq 3.500$	Each individual value of the R4b positive control optical densities must be between 1.500 and 3.500. However, a maximum of one individual aberrant value can be eliminated when its optical density is lower than 1.500 or higher than 3.500. The test must be repeated if the two R4b positive control OD lie outside of this limit.

b) Interpretation of the results

The Threshold Value is equal to the mean of the two R4a Positive controls ($\overline{S3}$) and corresponds to the seroconversion threshold value at 0.5 EU/ml.

High seroconversion Value is equal to the mean of the two R4b Positive control ($\overline{OD\ R4b}$), or to the single R4b positive control if one aberrant value has been eliminated.

Optical Density of each sample is compared to this High seroconversion and Threshold Value.

Criteria	Result	Validation
Seroconverted +++	$OD\ sample > \overline{OD\ R4b}$	Samples with OD value greater than the High Seroconversion Value originate from individuals who have highly seroconverted after vaccination according to PLATELIA RABIES II test.
Seroconverted	$\overline{OD\ R4a} \leq OD\ sample \leq \overline{OD\ R4b}$	Samples with OD value greater than or equal to the Threshold Value and lower than or equal to the High Seroconversion Value originate from individuals who have seroconverted after vaccination according to PLATELIA RABIES II test.
Not seroconverted	$OD\ sample < \overline{OD\ R4a}$	Samples with OD value lower than the Threshold Value originate from individuals presenting a level of seroconversion insufficient to assess the efficiency of the vaccination according to PLATELIA RABIES II test.

2. Quantitative determination

For the quantitative determination, include all the standards and controls (S1 to S6, R3 and R4a) for each test run.

a) Conditions of validation

Criteria	Validation
$OD\ R3(i) < 0.05$	The absorbance of each individual negative control must be lower than 0.05. The test must be repeated if at least one value lies outside of this limit.
$0.300 \leq OD\ R4a(i) \leq 1.200$	Each individual value of the R4a positive control optical densities must be between 0.300 and 1.200 . The test must be repeated if at least one of the R4a OD value lies outside of this limit.
$\overline{S1} < \overline{S2} < \overline{S3} < \overline{S4} < \overline{S5} < \overline{S6}$	Calculate the mean OD for S1 to S6 in the following way: $\overline{S1}$ = mean of the two S1 ODs (corresponds to 0.125 EU/ml). $\overline{S2}$ = mean of the two S2 ODs (corresponds to 0.25 EU/ml) etc. The signals of the standards must increase in the following way: $\overline{S1} < \overline{S2} < \overline{S3} < \overline{S4} < \overline{S5} < \overline{S6}$.
$0.7 \leq \overline{S3/R4a}\ ODs \leq 1.3$	The ratio between $\overline{S3}$ (mean S3 standard) and $\overline{R4a}$ (mean R4a) must be between 0.7 and 1.3.

b) Interpretation of the results

The Threshold Value is equal to the mean of the two OD of the S3 Quantification standard (OD R4a). The S3 Quantification standard corresponds to the seroconversion threshold value 0.5 EU/ml.

The quantity of anti-rabies antibodies in a sample is determined by comparing the optical density of the sample to a standard curve.

Sera titres are expressed as Equivalent units per ml (EU/ml), unit equivalent to the international units defined by seroneutralization.

Drawing the standard curve:

For manual data reduction, use graph paper and plot the mean values of the OD readings of the Quantification standards (S1 to S6) on the vertical (y) axes. Plot the corresponding concentrations in EU/ml on the horizontal (x) axes. Draw a series of line segments which goes through the 6 points.

For automated data reduction, a "point-to-point" function is used to construct a curve from the OD readings obtained for the standards.

A quantitative result for the anti-rabies antibodies titre for an unknown sample can be delivered if the OD value for the sample ranges between the S1 (0.125 EU/ml) and the S6 (4 EU/ml) Optical Density mean values. In this case, the unknown sample titre is found using the Standard curve. On the Standard curve, find the value corresponding to the OD reading of the sample on the y-axis and draw a horizontal line to the standard curve. At the point of the intersection with the standard curve, draw a vertical line to the x-axis. Read the corresponding concentration in EU/ml.

If the OD value of the unknown sample is higher than the mean Optical Density value for the S6 standard, a precise quantification cannot be performed. If a precise quantification is required, proceed to 1/10 dilution or more of the sample and perform the assay again in order to have an Optical Density in the interval of the Standard curve.

Note: An interpretation and conversion tool of OD values into titres is available on request (Rabies QT-ELISA BIORAD-Vers.200712.A.XLS) for users who are not equipped with Bio-Rad readers.

Results in Optical Density for the unknown sample	Titre for the unknown sample (X)	Interpretation of the result
OD sample $> \overline{S6}$	$X > 4$ EU/ml	High seroconversion level. If a precise titre is required, the sample must be diluted before repeating the assay.
$\overline{S3} \leq \text{OD sample} \leq \overline{S6}$	X in EU/ml (0.5 - 4 EU/ml)	Sufficient seroconversion level.
$\overline{S1} \leq \text{OD sample} < \overline{S3}$	X in EU/ml (0.125 - 0.5 EU/ml)	Insufficient seroconversion level according to PLATELIA RABIES II test.
OD sample $< \overline{S1}$	-	Undetectable seroconversion.

General comprehension of the results:

10 - LIMITATIONS OF THE TEST

Insufficient or undetectable seroconversion can possibly be reported in recently vaccinated animals, due to delayed immune response. Similarly to the official neutralising antibody titration method and in accordance with regulations (EC) No 998/2003 effective July 3, 2004, the PLATELIA RABIES II test should be carried out on samples taken at least thirty days after vaccination.

11 - EQUIPMENT AND MATERIAL REQUIRED BUT NOT SUPPLIED

Equipment

- Microplate reader equipped with 450 and 620 nm filters (*)
- Microplate incubator set at $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Manual, semi-automatic or automatic microplate washer (*)
- Vortex® mixer.

(*) *Contact us for detailed information about Bio-Rad instruments validated by our technical departments.*

Material

- Automatic or semi-automatic adjustable or preset pipettes or micropipettes to measure and deliver 10 to 1000 µl and 1, 2 and 10 ml.
- Graduated cylinders of 25 ml, 50 ml, 100 ml, and 1 000 ml capacity.
- Disposable tubes.
- Distilled or deionized water.
- Sodium hypochloride (bleach).
- Absorbent paper.
- Goggles or safety glasses.
- Disposable latex gloves.
- Container for biohazard waste.

12 - PRECAUTIONS

1. Precautions

The quality of the results depends on correct implementation of the following good laboratory practices:

- Reagents must be stored at $+2^{\circ}\text{C}$ to $+8^{\circ}\text{C}$.
- Do not use expired reagents.
- Do not mix reagents from different lots within a given test run with the exception of generic reagents R2, R8, R9, R10.
- Before use, wait 30 minutes for the reagents to adjust to the laboratory temperature.
- Thoroughly reconstitute reagents, avoiding any contaminations.
- Do not perform the test in the presence of reactive vapors (acids, alkalis, aldehydes) or dust that could alter enzyme activity of the conjugate.
- Use glassware thoroughly washed and rinsed with deionized water or preferably, disposable material.
- Do not leave the microplate more than 5 minutes between the end of washing operation and the reagent distribution.
- Check the accuracy of the pipettes and the good operation of the apparatus used.
- Never use the same container to distribute conjugate and the development solution.

- The enzyme reaction is very sensitive to metal or metallic ions. Consequently, do not allow any metal element to come in contact with the various conjugate or substrate solution.
- The development solution (substrate buffer + chromogen) must be colourless. The appearance of a blue colour within a few minutes after reconstitution of the development solution indicates that the reagent can not be used and must be replaced. Preparation of this solution can be made in a clean disposable plastic tray or glass container that has first been pre-washed with 1N HCl, and rinsed thoroughly with distilled water and dried. Store the solution in the dark.
- Use a new pipette tip for each sample.
- Do not change the assay procedure.
- Washing of the wells is a crucial step in the procedure: respect the recommended number of washing cycles and make sure that all wells are completely filled, then emptied. Inadequate washing can give incorrect results.

2. Hygiene and safety instructions

Generally, hygiene conditions, biosafety measures and good laboratory practices must be in agreement with recommendation of regular authorities of the country.

All the reagents of the kit are intended for “*in vitro*” veterinary diagnostic use - dog, cat and fox sera.

- Wear disposable gloves when handling reagents and samples. Thoroughly wash your hands after sample and reagent handling.
- Do not pipette with the mouth.
- Consider any material directly in contact with the samples and the reagents, as well as the wash solutions, as infectious material.
- Avoid spilling samples or solutions containing samples.
- Spills may be rinsed with bleach diluted to 10% Chl. If the contaminating fluid is acid, spills must be initially neutralized with sodium bicarbonate, then cleaned with bleach and dried with absorbent paper. The material used for cleaning must be discarded after decontamination.
- Samples and contaminated material and products should be discarded after decontamination
 - either by immersion in bleach at the final concentration at 5% of sodium hypochloride for 30 min.
 - or by autoclaving at 121°C for 2 hours minimum.

Caution: Do not introduce solutions containing sodium hypochloride into the autoclave.

- Chemicals should be handled and disposed of in accordance with Good Laboratory Practice.
- For hazard and precaution recommendations related to some chemical components in this test kit, please refer to the pictogram(s) mentioned on the labels and the information supplied at the end of instruction for use. The Safety Data Sheet is available on www.bio-rad.com.

13 - LITERATURE

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 J.L. , BLANCHARD I., BOURHY H. 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 g-globulin. *J. Immunol.* 97, 822-827.
17. GRASSI M., WANDELER A.I., 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-PAVLINIC M., HOSTNIK P., LEVICNIK-STEZINAR S., ZALETEL-KRAGELJ 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 K.J., 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.

PLATELIA RABIES II

Ad Usum Veterinarium

 192

REF 3550180

TROUSSE DE RÉACTIFS POUR LA DÉTECTION ET LE TITRAGE DES IgG
ANTI-GLYCOPROTÉINE DU VIRUS RABIQUE DANS LE SÉRUM DE CHIEN,
DE CHAT OU DE RENARD

Tous les produits fabriqués et commercialisés sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis.

Chaque lot du produit fini fait l'objet d'un contrôle qualité et n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation.



2023/10

BIO-RAD

TABLE DES MATIÈRES

- 1 - UTILISATION
- 2 - INTÉRÊT DU KIT PLATELIA RABIES II
- 3 - PRINCIPE DU TEST PLATELIA RABIES II
- 4 - COMPOSITION DU KIT PLATELIA RABIES II
- 5 - PRÉPARATION DES RÉACTIFS
- 6 - CONSERVATION, VALIDITÉ
- 7 - PRÉPARATION DES ÉCHANTILLONS
- 8 - MODE OPÉRATOIRE
- 9 - CALCUL ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS
- 10 - LIMITES DU TEST
- 11 - MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI
- 12 - PRÉCAUTIONS D'EMPLOI
- 13 - BIBLIOGRAPHIE

1 - UTILISATION

La trousse PLATELIA RABIES II est un test ELISA de diagnostic *in vitro* permettant la détection et le titrage des IgG anti-glycoprotéine du virus rabique dans le sérum animal (chien, chat, renard).

2 - INTÉRÊT DU KIT PLATELIA RABIES II

La Rage est une pathologie très ancienne pouvant affecter aussi bien l'homme que l'animal. Le virus rabique est un virus hautement neurotrope qui cause chez les mammifères une encéphalite fatale. Le virus est principalement transmis par la salive lors de morsures d'animaux enrégés. Les programmes de vaccination et de contrôle des populations animales ont permis l'élimination de la pathologie dans plusieurs pays d'Europe de l'Ouest et d'Amérique du Sud.

Depuis le 3 Juillet 2004, une nouvelle réglementation Européenne est applicable pour les transports internationaux de carnivores domestiques entre pays infectés et pays indemnes de rage.

Les carnivores domestiques peuvent voyager si leur sérum contient au moins 0,5 UI/ml (Unités internationales/ml) d'anticorps neutralisants.

Le titrage des anticorps a plusieurs applications pratiques :

- Sérologie individuelle pour les échanges internationaux : les anticorps anti-rabiques sont titrés dans des laboratoires spécialisés afin de déterminer le degré d'immunité des animaux vaccinés (chiens, chats). Un titre en anticorps supérieur ou égal à 0,5 UI/ml est considéré par les experts de l'OIE comme une séroconversion suffisante pour considérer la vaccination efficace.
- Confirmation du statut vaccinal lors de campagnes de vaccination : le contrôle des anticorps anti-rabiques permet d'évaluer l'efficacité des campagnes de vaccination orale des carnivores sauvages (renards).

3 - PRINCIPE DU TEST PLATELIA RABIES II

PLATELIA RABIES II est une technique immuno-enzymatique pour le dépistage des anticorps anti-glycoprotéine du virus rabique. Ce test peut être pratiqué sur le sérum de plusieurs espèces animales - chien, chat, renard.

L'essai repose sur une technique immuno-enzymatique ELISA indirecte. La phase solide est constituée d'une microplaque sensibilisée avec la glycoprotéine extraite de la membrane de virus inactivé et purifié. Le conjugué enzymatique est constitué d'une protéine A de *Staphylococcus aureus* couplé avec la peroxydase. Les contrôles positifs, calibrés selon le standard de référence OIE, permettent la détection qualitative ainsi que la quantification des anticorps anti-rabiques dans le sérum.

La mise en œuvre du test comprend les étapes réactionnelles suivantes :

- 1 - Les sérums à étudier, ainsi que les contrôles positifs ou la Gamme de Quantification sont distribués dans les cupules des microplaques. Durant une incubation de 1 heure à 37°C, les anticorps antirabiques présents dans l'échantillon se lient à la glycoprotéine fixée sur les microplaques. Après incubation, les anticorps non fixés ainsi que les autres protéines sériques sont éliminées par lavages.
- 2 - Le conjugué (protéine A marquée à la peroxydase) est ajouté dans les puits. Durant une seconde incubation de 1 heure à 37°C, la protéine A marquée se lie aux complexes antigène-anticorps antirabiques retenus par la phase solide. Le conjugué non lié est ensuite éliminé par lavages.

- 3 - La présence du complexe immunitaire est révélée par addition d'une solution contenant un substrat marqué à la peroxydase et un chromogène, induisant le développement de la réaction colorée.
- 4 - Après 30 minutes d'incubation à température ambiante, la réaction enzymatique est stoppée par ajout d'une solution de H_2SO_4 1N. La densité optique lue sur un spectrophotomètre à 450 - 620 nm est proportionnelle à la quantité d'anticorps antirabique présents dans l'échantillon. Une courbe de référence est construite à partir de la Gamme de Quantification (S1 à S6), obtenue par dilutions du contrôle positif R4b.

La valeur de la Densité Optique des échantillons testés est comparée à celle des contrôles positifs. Pour le titrage quantitatif, les titres sont obtenus après une lecture directe de la courbe de référence et sont exprimés en Unités Équivalentes par ml (EU/ml), unités équivalentes aux Unités Internationales définies par séroneutralisation.

4 - COMPOSITION DU KIT PLATELIA RABIES II

Tous les réactifs sont destinés à l'usage du diagnostic vétérinaire *in vitro*.

Les réactifs sont en quantité suffisante pour 2 x 96 tests. Sur chaque microplaque, 90 échantillons peuvent être analysés avec la méthode qualitative.

Si la méthode de quantification est effectuée, jusqu'à 80 échantillons par microplaque peuvent être quantifiés de manière précise.

ETIQUETAGE	NATURE DES REACTIFS	PRÉSENTATION
R1	Microplaque : 12 barrettes de 8 puits sensibilisés avec la glycoprotéine du virus rabique	2 plaques
R2	Solution de lavage : concentré 10 fois, Tampon Tris-NaCl Consevateur : ProClin™ 300 (0,01 %)	1 flacon (250 ml)
R3	Contrôle négatif : contrôle non réactif Tris-EDTA Conservateur : ProClin™ 300 (0,1%)	1 flacon (0,6 ml)
R4a	Contrôle Positif 0,5 EU/ml : contrôle positif calibré à 0.5 EU/ml Tampon glycine contenant de la BSA et du sérum canin avec des IgG anti-rabiques. Couleur jaune Conservateur : ProClin™ 300 (0,1%)	1 flacon (0,6 ml)
R4b	Contrôle Positif 4 EU/ml : contrôle positif calibré à 4 EU/ml Tampon glycine contenant de la BSA et du sérum canin avec des IgG anti-rabiques. Couleur bleue Conservateur : ProClin™ 300 (0,1%)	1 flacon (0,6 ml)
R6	Diluant échantillons : Tampon TRIS - EDTA prêt-à-l'emploi Couleur rouge. Conservateur : ProClin™ 300 (0,1%)	2 flacons (2 x 125 ml)
R7	Conjugué : Tampon PBS contenant Protéine A - Peroxydase, protéine bovine purifiée. Concentré 10 fois. Couleur verte. Conservateur : ProClin™ 300 (0,1%)	1 flacon (3 ml)
R8	Tampon substrat de la peroxydase : Solution d'acide citrique et d'acétate de sodium contenant 0,015% de H ₂ O ₂ et 4% de diméthylsulfoxyde (DMSO)	1 flacon (60 ml)
R9	Chromogène : Solution de tétraméthylbenzidine (TMB) 0,25%	1 flacon (5 ml)
R10	Solution d'arrêt : Acide sulfurique 1 N	1 flacon (28 ml)
	Films adhésifs pour microplaques	6

5 - PRÉPARATION DES RÉACTIFS

Note :

Avant utilisation, laisser les réactifs revenir à température ambiante (+18°C à +30°C) pendant 30 minutes.

Homogénéiser les réactifs avant ouverture.

1 - Réactifs prêts-à-l'emploi

• Microplaques (R1)

Avant l'ouverture du sachet sous vide, laisser la microplaque revenir à température ambiante (+18°C à +30°C) dans son emballage protecteur, afin d'éviter toute condensation d'eau dans les puits. Les barrettes non utilisées doivent immédiatement être replacées dans le sachet, refermer hermétiquement le sachet après avoir pris soin de chasser l'air, et conserver de +2°C à +8°C.

• Diluant échantillon (R6)

• Solution d'arrêt (R10)

2 - Réactifs à reconstituer

• Solution de lavage (R2)

Diluer la solution de lavage R2 au 1/10^e dans de l'eau distillée (par exemple 100 ml de réactif R2 dans 900 ml d'eau distillée), sachant que 500 ml de solution suffisent pour une microplaque.

• Contrôle négatif (R3)

Diluer la solution au 1/100^e dans le réactif R6.

• Contrôle positif 0.5 EU/ml (R4a)

Diluer le contrôle positif R4a au 1/100^e dans le réactif R6.

• Contrôle positif 4 EU/ml (R4b)

Diluer le contrôle positif R4b au 1/100^e dans le réactif R6.

• Conjugué (R7)

La solution est concentrée 10 fois. Diluer le réactif R7 au 1/10^e dans la solution de lavage fraîchement reconstituée (1 volume de réactif R7 dans 9 volumes de solution de lavage reconstituée). 11 ml sont suffisants pour une microplaque.

• Solution de développement enzymatique (R8 + R9)

Diluer le réactif R9 au 1/11^e dans le réactif R8 (par exemple 0,1 ml de réactif R9 dans 1 ml de réactif R8), sachant que 11 ml de solution de révélation enzymatique sont suffisants pour une microplaque.

Homogénéiser délicatement. Ne pas mélanger au Vortex®.

3 - Préparation de la Gamme de Quantification pour un test quantitatif

Chaque test quantitatif utilisant le kit PLATELIA RABIES II doit comporter 6 standards de Quantification – de S1 à S6.

Le Contrôle Positif R4b (calibré à 4 EU/ml) correspond au standard de Quantification S6. Les dilutions en série du réactif R4b permettent la préparation des standards de Quantification S5 à S1. Les dilutions sont effectuées avec le diluant échantillons (réactif R6).

Standards de Quantification		Concentrations obtenues par dilutions du contrôle positif R4b
S6	R4b dilué au 1/100°	4 EU/ml
S5	S6 dilué au 1/2	2 EU/ml
S4	S5 dilué au 1/2	1 EU/ml
S3	S4 dilué au 1/2	0,5 EU/ml
S2	S3 dilué au 1/2	0,25 EU/ml
S1	S2 dilué au 1/2	0,125 EU/ml

6 - CONSERVATION - VALIDITÉ

Tous les composants du kit PLATELIA RABIES II doivent être conservés de +2°C à +8°C et peuvent être utilisés jusqu'à la date d'expiration indiquée sur le kit. Le réactif R2 (10 X) peut être stocké de +2°C à +25°C avant dilution.

Après préparation, les réactifs ont les stabilités suivantes :

	RÉACTIFS	REMARQUES	VALIDITÉ
R1	Microplaque	Après l'ouverture du sachet sous vide, les barrettes non utilisées doivent être immédiatement replacées dans le sachet et celui-ci scellé à nouveau. Le déshydratant doit rester à l'intérieur du sachet.	1 mois de +2°C à +8°C
R2	Solution de lavage diluée		2 semaines de +2°C à +8°C
R7	Conjugué reconstitué	La solution de conjugué reconstituée doit de préférence être utilisée immédiatement.	8 heures de +2°C à +8°C
R8 + R9	Solution de révélation		6 heures à température ambiante (+18°C à +30°C) impérativement à l'obscurité

7 - ÉCHANTILLONS

- Le test PLATELIA RABIES II a été développé pour une utilisation sur le sérum animal (chien, chat, renard).
- Le test est effectué sur sérum, après dilution au 1/100° dans du réactif R6.
- Les échantillons seront conservés de +2°C à +8°C si le dépistage est effectué dans les 24 heures, ou peuvent être conservés congelés à -20°C pendant 6 mois. Les échantillons peuvent être soumis à 3 cycles de congélation-décongélation successifs. Les échantillons décongelés doivent être homogénéisés avec soin avant d'être testés.

NB : Éliminer, si besoin par centrifugation, les particules ou les agrégats de fibrine en suspension qui peuvent donner des résultats faussement positifs.

8 - MODE OPÉRATOIRE

Suivre strictement le protocole recommandé.

Utiliser les contrôles négatifs et positifs pour chaque essai et à chaque microplaque afin de valider la qualité de la détection dans le test Qualitatif. Pour une utilisation en méthode Quantitative, le contrôle négatif et la Gamme de Quantification doivent être déposés sur chaque microplaque. Dans les deux cas, suivre le plan de plaque recommandé.

Appliquer les bonnes pratiques de laboratoire.

1. Sortir de l'emballage protecteur le cadre support et le nombre de barrettes (R1) nécessaires. Remettre les barrettes non utilisées, avec le sachet de déshydratant, dans l'emballage et refermer celui-ci hermétiquement.
2. Établir soigneusement le plan de distribution et d'identification des échantillons :

Plan de distribution pour la méthode Qualitative :												
	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...										

Plan de distribution pour la méthode Quantitative :												
	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. Pour la méthode qualitative, diluer les contrôles négatifs et positifs R3, R4a et R4b ainsi que les échantillons à tester au 1/100^e dans le réactif R6. (ex : 10 µl d'échantillon dans 990 µl de solution de dilution).
4. Pour la méthode quantitative, préparer la Gamme de Quantification (Voir chapitre 5.3) et diluer les contrôles négatifs R3 et positifs R4a ainsi que les échantillons à tester au 1/100^e dans le réactif R6. (ex : 10 µl d'échantillon dans 990 µl de solution de dilution).
5. Distribuer 100 µl de contrôle négatif et positif, de standards de Quantification et d'échantillon dilués dans les puits correspondants en suivant le plan de distribution pré-établi.
6. Recouvrir d'un film adhésif (découper la feuille si nécessaire). Presser fermement afin d'assurer un scellage hermétique.
7. Incuber à 37°C ± 2°C pendant 60 minutes ± 5 minutes.
8. Préparer la solution de lavage (R2) [cf. chapitre 5].
9. Préparer la solution de conjugué (R7) - cf. chapitre 5 - avant la fin de la première incubation.
10. Retirer le film adhésif et effectuer 3 cycles de lavage. Les conditions de lavage optimales sont obtenues avec les laveurs Bio-Rad PW40, PW41 ou 1575 sur le programme TSE 3. Ne pas laisser la microplaque plus de 5 minutes après le dernier cycle de lavage. Sécher par retournement sur du papier absorbant avant l'étape suivante.
11. Distribuer 100 µl de solution de conjugué (R7) dans chaque puits. Recouvrir avec un nouveau film adhésif et incuber à 37°C ± 2°C pendant 60 minutes ± 5 minutes.
12. Préparer la solution de révélation enzymatique (R8+R9) tel que décrit dans le chapitre 5 juste avant utilisation.
13. Retirer le film adhésif et effectuer 5 cycles de lavage. Les conditions de lavage optimales sont obtenues avec les laveurs Bio-Rad PW40, PW41 et 1575 Bio-Rad, sur le programme TSE 5. Ne pas laisser la microplaque plus de 5 minutes après le dernier cycle de lavage. Sécher par retournement sur du papier absorbant avant l'étape suivante.
14. À l'abri de la lumière directe, distribuer rapidement 100 µl de solution de révélation (R8 + R9) dans chaque puits et incuber les microplaques pendant 30 minutes ± 5 minutes à l'obscurité et à température ambiante (+18°C à +30°C).
NB: Ne pas utiliser de film adhésif pendant cette incubation.
15. Ajouter 100 µl de solution d'arrêt (R10) dans chaque puits dans le même ordre et avec le même rythme que pour la solution de révélation.
16. Essuyer soigneusement le dessous de la plaque et lire les densités optiques en bichromatisme à 450 - 620 nm dans les 30 minutes qui suivent l'arrêt de la réaction (les barrettes doivent toujours être protégées de la lumière avant lecture).
17. Avant l'enregistrement des résultats, vérifier que la lecture et le plan de distribution et d'identification des plaques et des échantillons concordent bien.

PARAMÈTRES DE LAVAGE DES MICROPLAQUES

NOM : TSE 3

EDIT Mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CROSS/W ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	N° OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	N° OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575)	118 PW40/1575/28 (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	-	-	-

NOM : TSE 5

EDIT Mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CROSS/W ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	N° OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	N° OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575)	118 PW40/1575/28 (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	-	-	-

NOM DE LA PLAQUE : 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 - CALCUL ET INTERPRÉTATION DES RÉSULTATS

Les résultats sont rendus en Densité Optique (DO) après lecture des microplaques en bichromatisme à 450 - 620 nm.

1. Détermination qualitative

Pour une détermination qualitative du statut immunologique, inclure tous les contrôles (R3, R4a et R4b) à chaque essai.

a) Conditions de validation

Critères	Validation
$OD\ R3(i) < 0,05$	La densité optique de chaque valeur individuelle du contrôle négatif doit être inférieure à 0,05. Le test doit être répété si au moins une valeur de contrôle négatif dépasse cette limite.
$0,300 \leq OD\ R4a(i) \leq 1,200$	La densité optique de chaque valeur individuelle du contrôle positif R4a doit être située entre 0,300 et 1,200. Le test doit être répété si au moins une valeur du contrôle positif R4a est située en-dehors de ces limites.
$1,500 \leq OD\ R4b(i) \leq 3,500$	La densité optique de chaque valeur individuelle du contrôle positif R4b doit être située entre 1,500 et 3,500. Cependant, on peut éliminer au maximum une valeur aberrante lorsque sa densité optique est inférieure à 1,500 ou supérieure à 3,500. Le test doit être répété si les densités optiques des deux contrôles positifs R4b sont situées en-dehors de ces limites.

b) Interprétation des résultats

La valeur seuil est égale à la moyenne des DO des deux contrôles positifs R4a ($\overline{R4a}$) et correspond au seuil de séroconversion de 0,5 UI/ml.

La valeur de séroconversion haute est égale à la moyenne des deux contrôles positifs R4b ($\overline{DO\ R4b}$), ou au contrôle positif R4b unique si une valeur aberrante a été éliminée.

La Densité Optique de chaque échantillon est comparée à la valeur de séroconversion haute et à la valeur seuil.

Statut	Resultat	Interprétation
Séroconversion +++	$DO\text{ échantillons} > \overline{DO\ R4b}$	Les échantillons dont la densité optique (DO) est supérieure à la valeur de séroconversion haute proviennent d'individus ayant une forte séroconversion après vaccination selon le test PLATELIA RABIES II.
Séroconversion	$\overline{DO\ R4a} \leq DO\text{ échantillons} \leq \overline{DO\ R4b}$	Les échantillons dont la densité optique (DO) est supérieure ou égale à la valeur seuil et inférieure ou égale à la valeur de séroconversion haute proviennent d'individus ayant une séroconversion suffisante après vaccination selon le test PLATELIA RABIES II.
Pas de Séroconversion	$DO\text{ échantillons} < \overline{DO\ R4a}$	Les échantillons dont la densité optique (DO) est inférieure à la valeur seuil proviennent d'individus présentant un niveau de séroconversion insuffisant pour garantir l'efficacité de la vaccination selon le test PLATELIA RABIES II.

2. Détermination quantitative

Pour une détermination quantitative du titre en anticorps, inclure tous les standards et les contrôles (S1 à S6, R3 et R4a) à chaque essai.

a) Conditions de validation

Critères	Validation
$DO\ R3(i) < 0,05$	La densité optique de chaque valeur individuelle du contrôle négatif doit être inférieure à 0,05. Le test doit être répété si au moins une valeur de contrôle négatif dépasse cette limite.
$0,300 \leq DO\ R4a(i) \leq 1,200$	La densité optique de chaque valeur individuelle du contrôle positif R4a doit être située entre 0,300 et 1,200. Le test doit être répété si au moins une valeur du contrôle positif R4a est située en-dehors de ces limites.
$\overline{S1} < \overline{S2} < \overline{S3} < \overline{S4} < \overline{S5} < \overline{S6}$	Calculer la moyenne des DO pour S1 à S6 comme suit : $\overline{S1}$ = moyenne des densités optiques des deux S1 (correspond à 0,125 UI/ml). $\overline{S2}$ = moyenne des densités optiques des deux S2 (correspond à 0,25 UI/ml) etc. <u>Le signal des standards doit augmenter de la façon suivante :</u> $\overline{S1} < \overline{S2} < \overline{S3} < \overline{S4} < \overline{S5} < \overline{S6}$.
$0,7 \leq \overline{S3/R4a}\ DO \leq 1,3$	Le rapport entre $\overline{S3}$ (moyenne des DO S3) et $\overline{R4a}$ (moyenne des DO R4a) doit être situé entre 0,7 et 1,3.

b) Interprétation des résultats

La valeur seuil est égale à la moyenne des densités optiques des deux standards de quantification S3. Le standard de quantification (S3) correspond au seuil de séroconversion de 0,5 UE/ml.

La quantité d'anticorps antirabiques d'un échantillon est déterminée par la comparaison de la densité optique de l'échantillon avec une courbe de référence.

Les titres sont exprimés en Unités Équivalentes par ml (EU/ml), unités équivalentes aux unités internationales définies par séroneutralisation.

Tracé de la courbe de référence :

Pour déterminer les données manuellement, utiliser du papier millimétré et pointer les valeurs correspondant aux moyennes des standards de quantification (S1 à S6) sur l'axe vertical (y). Pointer les concentrations correspondantes en EU/ml sur l'axe des abscisses (x). Tracer des segments de droite passant par ces 6 points pour obtenir la courbe de référence.

Pour une analyse automatique des données, une fonction "point à point" est utilisée pour construire la courbe à partir des DO des standards de quantification.

La valeur quantitative du titre en anticorps antirabiques pour un échantillon inconnu peut être donnée si sa DO est située entre les DO moyennes des S1 (0,125 UE/ml) et des S6 (4 UE/ml). Dans ce cas, le titre recherché est obtenu en utilisant la courbe de référence : tracer une ligne horizontale au niveau de la valeur de la DO de l'échantillon. Au point de rencontre avec la courbe, tracer une ligne verticale vers l'axe des abscisses. Lire la concentration correspondante en EU/ml.

Si la DO de l'échantillon est supérieure à la moyenne des DO des S6, la quantification précise n'est pas possible. Pour obtenir un résultat précis, diluer l'échantillon au 1/10^e ou plus et recommencer l'essai afin d'obtenir une DO incluse dans les limites de la courbe de référence.

Note : Un outil d'interprétation et de conversion des DO en titre est disponible sur demande (Rabies QT-ELISA BIORAD-Vers.200712.A.XLS) pour les utilisateurs qui ne sont pas équipés d'un lecteur Bio-Rad.

Compréhension générale des résultats :

Résultats en Densité Optique de l'échantillon testé	Titre de l'échantillon testé (X)	Interprétation du résultat
DO échantillon > $\overline{S6}$	$X > 4$ EU/ml	Niveau élevé de séroconversion. Si le titre précis est nécessaire, l'échantillon doit être dilué avant de recommencer l'essai.
$\overline{S3} \leq \text{DO échantillon} \leq \overline{S6}$	X en EU/ml (0,5 - 4 EU/ml)	Niveau suffisant de séroconversion.
$\overline{S1} \leq \text{DO échantillon} < \overline{S3}$	X en EU/ml (0,125 - 0,5 EU/ml)	Niveau de séroconversion insuffisant selon le test PLATELIA RABIES II.
DO échantillon < $\overline{S1}$	-	Pas de séroconversion détectable.

10 - LIMITES DU TEST

Une séroconversion insuffisante ou non détectable peut être observée chez des animaux récemment vaccinés, en raison d'un délai d'immunisation insuffisant. Comme pour la méthode de référence et conformément au règlement CE N°998/2003 du 26 mai 2003, le prélèvement doit être effectué au minimum 30 jours après la vaccination.

11 - MATÉRIEL NÉCESSAIRE MAIS NON FOURNI

Équipement

- Lecteur de microplaques muni de filtres 450 et 620 nm (*).
- Incubateur pour microplaques thermostaté à $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Laveur de microplaques manuel, semi-automatique ou automatique (*).
- Mélangeur Vortex®.

(*) *Contactez-nous pour plus de détails sur les appareils Bio-Rad validés par nos services techniques.*

Matériel

- Pipettes fixes ou réglables, automatiques ou semi-automatiques, pouvant distribuer des volumes de 10 à 1000 µl et 1, 2 et 10 ml.
- Tubes à essais gradués de 25 ml, 50 ml, 100 ml, et 1 000 ml.
- Tubes à usage unique.
- Eau distillée ou déionisée.
- Eau de Javel.
- Papier absorbant.
- Lunettes de sécurité ou masque à visière.
- Gants de latex à usage unique.
- Conteneur pour déchets contaminés.

12 - PRÉCAUTIONS D'EMPLOI

1. Précautions

La qualité des résultats dépend de l'observation des bonnes pratiques de laboratoire suivantes

:

- Les réactifs doivent être conservés à une température de $+2^{\circ}\text{C}$ à $+8^{\circ}\text{C}$.
- Ne pas utiliser de réactifs au-delà de la date de péremption.
- Ne pas mélanger ou associer, pendant la même manipulation, des réactifs provenant de kits de lots différents - à l'exception des réactifs génériques R2, R8, R9, R10.
- Laisser les réactifs revenir à température ambiante pendant 30 minutes avant utilisation.
- Reconstituer soigneusement les réactifs, en évitant toute contamination.
- Ne pas effectuer le test en présence de vapeurs réactives (acides, bases, aldéhyde) ou de poussières, car cela pourrait altérer l'activité enzymatique du conjugué.
- La verrerie doit être parfaitement lavée et rincée à l'eau distillée ou, de préférence, être constituée de produits à usage unique.
- Ne pas laisser la microplaque sécher entre la fin du lavage et la distribution des réactifs.
- Vérifier le bon état des pipettes et des appareils utilisés.
- Ne jamais utiliser le même récipient pour distribuer le conjugué et la solution de révélation.

- La réaction enzymatique est très sensible à tous les métaux ou ions métalliques. En conséquence, aucun élément métallique ne doit entrer en contact avec les différentes solutions contenant le conjugué ou le substrat.
- La solution de révélation (tampon du substrat + chromogène) doit être incolore. L'apparition d'une coloration bleue quelques minutes après la reconstitution est signe d'altération du réactif, qui ne doit pas être utilisé. La solution de révélation doit de préférence être préparée avec des récipients en plastique à usage unique et du matériel de distribution ou de la verrerie préalablement lavés avec de l'acide chlorhydrique 1 N, rincés à l'eau distillée et séchés. Conserver cette solution à l'abri de la lumière.
- Changer d'embout pour chaque échantillon.
- Ne pas modifier le mode opératoire.
- Le lavage des puits est une étape essentielle de la procédure : respecter le nombre de cycles de lavage recommandés et vérifier que tous les puits sont totalement remplis, puis totalement vidés. Un lavage mal effectué peut donner des résultats incorrects.

2. Consignes d'hygiène et de sécurité

D'une façon générale, les conditions d'hygiène, de sécurité et de bonnes pratiques de laboratoire devront être en accord avec la réglementation en vigueur.

Tous les réactifs de ce kit sont destinés au diagnostic vétérinaire *in vitro* (chiens, chats, renards).

- Porter des gants à usage unique pendant la manipulation des réactifs.
- Ne jamais pipeter à la bouche.
- Tous les matériels entrant en contact avec les échantillons et les réactifs, ainsi que les solutions de lavage, doivent être considérés comme contaminés.
- Éviter d'éclabousser les échantillons ou les solutions contenant des échantillons.
- Les surfaces contaminées doivent être nettoyées avec de l'eau de Javel à 10% chlorimétriques (CHL). Lorsque le liquide contaminant est un acide, les surfaces contaminées doivent d'abord être neutralisées avec de la soude avant d'utiliser l'eau de Javel, puis séchées avec du papier absorbant. Le matériel utilisé pour le nettoyage doit être jeté dans un récipient spécial pour déchets contaminés.
- Les échantillons, le matériel et les produits contaminés doivent être éliminés après décontamination:
 - Soit par trempage dans de l'eau de Javel à 5° chlorimétriques (CHL) pendant 30 minutes.
 - Soit par autoclavage à 121°C pendant 2 heures minimum.

Remarque : ne jamais autoclaver de solutions contenant de l'eau de Javel.

- Les produits chimiques doivent être manipulés selon les Bonnes Pratiques de Laboratoire.
- Pour connaître les recommandations liées aux risques et les précautions relatives à certains produits chimiques contenus dans ce kit, consulter le(s) pictogramme(s) figurant sur les étiquettes et les informations fournies à la fin des instructions d'utilisation. La fiche technique de sécurité est disponible sur www.bio-rad.com.

13 - BIBLIOGRAPHIE

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 J.L. , BLANCHARD I., BOURHY H. 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 g-globulin. *J. Immunol.* 97, 822-827.
17. GRASSI M., WANDELER A.I., 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-PAVLINIC M., HOSTNIK P., LEVICNIK-STEZINAR S., ZALETEL-KRAGELJ 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 K.J., 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.

PLATELIA RABIES II

Ad Usum Veterinarium

 192

REF 3550180

KIT PARA LA DETECCIÓN Y VALORACIÓN *IN VITRO* DE LA IgG CONTRA LA GLICOPROTEINA DEL VIRUS DE LA RABIA EN SUERO DE GATOS, PERROS Y ZORROS.

Todos los reactivos fabricados y comercializados se someten a un sistema de calidad completo que comienza en el momento de la recepción de la materia prima y va hasta la comercialización final del producto.

Cada lote está sometido a un control de calidad y sólo sale al mercado cuando se confirma que cumple con los criterios de aceptación.



2023/10

BIO-RAD

ÍNDICE

- 1 - USO PREVISTO
- 2 - INTERÉS DEL KIT PLATELIA RABIES II
- 3 - PRINCIPIO DE ENSAYO DE PLATELIA RABIES II
- 4 - COMPOSICIÓN DEL KIT PLATELIA RABIES II
- 5 - PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS
- 6 - ALMACENAMIENTO - PERÍODO DE CONSERVACIÓN
- 7 - MUESTRAS
- 8 - PROTOCOLO DE ENSAYO
- 9 - CÁLCULO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS
- 10 - LIMITACIONES DE LA PRUEBA
- 11 - EQUIPO Y MATERIALES REQUERIDOS Y NO SUMINISTRADOS
- 12 - PRECAUCIONES
- 13 - LITERATURA

1 - USO PREVISTO

El kit PLATELIA RABIES II es una prueba ELISA diagnóstica *in vitro* que permite la detección y valoración de la IgG contra la glicoproteína del virus de la rabia en suero animal (perros, gatos y zorros).

2 - INTERÉS DEL KIT PLATELIA RABIES II

La rabia es una de las enfermedades virales que más tiempo lleva afectando a los humanos y animales. El virus de la rabia es muy neurotrópico, causando una encefalitis casi siempre mortal en los mamíferos. La transmisión del virus se produce principalmente a través de la saliva por la mordedura de animales rabiosos. Los programas de inmunización y control para la protección de poblaciones animales contra el virus de la rabia han logrado eliminar la enfermedad en varios países de Europa Occidental y en algunos países de Sudamérica.

A partir del 3 de julio de 2004, entró en vigor un nuevo reglamento europeo sobre los desplazamientos internacionales de carnívoros domésticos de países infectados a países libres de rabia. Se permite que viajen los animales carnívoros domésticos si su suero contiene como mínimo 0,5 UI/ml (Unidades internacionales/ml) de anticuerpos neutralizantes de la rabia.

La valoración de los anticuerpos contra el virus de la rabia tiene varias aplicaciones prácticas:

- Serología individual con fines de comercio internacional: los anticuerpos contra el virus de la rabia se miden en laboratorios especializados para determinar el grado de inmunidad del animal vacunado (gatos y perros). Los expertos de la Organización Mundial de Sanidad Animal consideran que un nivel de anticuerpos igual o superior a 0,5 UI/ml constituye un nivel de seroconversión por encima del cual podría considerarse que la vacunación ha tenido éxito.
- Confirmación del estado de vacunación durante una campaña de vacunación: el control de los anticuerpos contra la rabia permite la evaluación indirecta de la eficacia de la campaña de vacunación oral de la fauna silvestre (zorros).

3 - PRINCIPIO DE ENSAYO DE PLATELIA RABIES II

PLATELIA RABIES II es una técnica inmunoenzimática para la detección de anticuerpos contra la glicoproteína del virus de la rabia. Este ensayo se puede realizar en el suero de varias especies de animales: gatos, perros y zorros.

La prueba se basa en el uso de una técnica de inmunoanálisis enzimático con fase sólida denominado ELISA indirecto. Una microplaca se recubre con glicoproteína de la rabia extraída de la membrana del virus inactivado y purificado. El conjugado enzimático consiste en una proteína A de *Staphylococcus aureus* asociado con peroxidasa. Los controles positivos, calibrados contra los patrones de la OIE, permiten la determinación cualitativa o cuantitativa del título de anticuerpos contra el virus de la rabia en suero.

La implementación de la prueba comprende los siguientes pasos de reacción:

- 1 - El suero desconocido y los controles positivos calibrados o los patrones de cuantificación se distribuyen en los pocillos de las microplacas recubiertos con glicoproteína. Durante la incubación a 37°C (una hora), los anticuerpos contra el virus de la rabia presentes en la muestra se unen a la glicoproteína que recubre los pocillos de la microplaca. Después de la incubación, los anticuerpos no unidos y otras proteínas séricas son eliminadas por lavados.

- 2 - Se agrega el conjugado (proteína A marcada con peroxidasa) a los pocillos de la microplaca. Durante una segunda incubación de una hora a 37°C, la proteína A marcada se une a los complejos antígeno-anticuerpo contra el virus de la rabia adherido a los pocillos de la microplaca. El conjugado no unido se elimina por lavados.
- 3 - La presencia de complejo inmune se demuestra por el agregado de una solución que contiene un sustrato de peroxidasa y un cromógeno, lo que inicia una reacción de desarrollo de color.
- 4 - Después de 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, la reacción enzimática se interrumpe por el agregado de una solución H_2SO_4 1N. La lectura de la densidad óptica obtenida con un espectrofotómetro configurado en 450 - 620 nm es proporcional a la cantidad de anticuerpos contra el virus de la rabia presente en las muestras. Se construye una curva estándar a partir de los estándares de cuantificación (S1 a S6) obtenidos por diluciones seriadas de los controles positivos calibrados R4b.

Los valores de densidad óptica de las muestras desconocidas se comparan con aquellas que han dado un control positivo. Los títulos en las pruebas de cuantificación se obtienen a partir de la lectura directa de la curva estándar y se expresa en unidades equivalentes por ml (UE/ml), unidad equivalente a las unidades internacionales definidas por la seroneutralización.

4 - COMPOSICIÓN DEL KIT PLATELIA RABIES II

Todos los reactivos están previstos para diagnóstico veterinario *in vitro* exclusivamente. Se proporcionan reactivos suficientes para realizar 2 x 96 análisis. En cada microplaca, se pueden analizar 90 muestras si se lleva a cabo una prueba cualitativa. Pueden ser cuantificadas con precisión un máximo de 80 muestras para los anticuerpos contra el virus de la rabia si se utiliza un sistema de cuantificación.

ROTULADO	TIPO DE REACTIVO	PRESENTACIÓN
R1	Microplaca: 12 tiras de 8 pocillos sensibilizados con la glicoproteína del virus de la rabia.	2 placas
R2	Solución de lavado: Tampón Tris-NaCl a una concentración 1:10. Conservante: ProClin™ 300 al 0,01 %	1 frasco (250 ml)
R3	Control negativo: Control no reactivo TRIS-EDTA Conservante: ProClin™ 300 al 0,1 %	1 frasco (0,6 ml)
R4a	0,5 UE / ml control positivo: 0,5 UE/ml control positivo calibrado Tampón glicina con BSA y suero de perro con anticuerpos contra la rabia IgG. Color amarillo. Conservante: ProClin™ 300 al 0,1 %	1 frasco (0,6 ml)
R4b	4 UE / ml control positivo: 4 UE/ml control positivo calibrado Tampón glicina con BSA y suero de perro con anticuerpos contra la rabia IgG. Color azul. Conservante: ProClin™ 300 al 0,1 %	1 frasco (0,6 ml)
R6	Diluyente de la muestra: Tampón TRIS – EDTA listo para usar para dilución de la muestra. Color rojo. Conservante: ProClin™ 300 al 0,1 %	2 frascos (2 x 125 ml)
R7	Conjugado: Solución con proteína A peroxidasa y proteína purificada de bovino. Concentrado 1:10. Color verde. Conservante: ProClin™ 300 al 0,1 %	1 frasco (3 ml)
R8	Tampón de sustrato de peroxidasa: Solución de ácido cítrico y acetato de sodio con un contenido de 0,015% de H ₂ O ₂ y dimetilsulfoxido al 4% (DMSO).	1 frasco (60 ml)
R9	Cromógeno: Tetrametilbenzidina (TMB) en solución al 0,25%	1 frasco (5 ml)
R10	Solución de parada: Solución de ácido sulfúrico 1N.	1 frasco (28 ml)
	Películas adhesivas para microplacas.	6

5 - PREPARACIÓN DE LOS REACTIVOS

Nota:

Antes de usar, deje que los reactivos alcancen la temperatura ambiente (+18 a +30°C) durante 30 minutos.

Homogeneice los reactivos girándolos antes de abrir.

1 - Reactivos listos para usar

• Microplacas (R1)

Antes de usarla, deje que la microplaca se ajuste a la temperatura ambiente (+18°C a +30°C) en su envoltorio protector a fin de impedir cualquier condensación de agua en los pocillos. Todas las tiras no utilizadas deberían introducirse nuevamente en la bolsa de forma inmediata. Cierre firmemente la bolsa tras haber expulsado el aire, a continuación almacénela a una temperatura de +2°C a +8°C.

• Diluyente de la muestra (R6)

• Solución de parada (R10)

2 - Reactivos a reconstituir

• Solución de lavado (R2)

Diluya la solución 1:10 en agua destilada (ejemplo 100 ml de reactivo R2 en 900 ml de agua destilada). Se necesitan 500 ml para una placa.

• Control negativo (R3)

Diluya la solución 1:100 en R6.

• 0.5 EU/ml control positivo (R4a)

Diluya el control positivo R4a 1:100 en R6

• 4 EU/ml control positivo (R4b)

Diluya el control positivo R4b 1:100 en R6

• Conjugado (R7)

La solución está concentrada 10 veces. Para preparar la solución de conjugado diluido, agregue 1 volumen de conjugado concentrado a 9 volúmenes de solución de lavado preparada 1x (R2). Se requieren 11 ml para una microplaca llena.

• Solución de desarrollo enzimático (R8 + R9).

Diluir el reactivo R9 a 1:11 en el reactivo R8 (ejemplo: 0,1 ml de reactivo R9 en 1 ml de reactivo R8) teniendo en cuenta que 11 ml de solución de revelación enzimática es suficiente para 1 microplaca.

Homogeneizar con suavidad. Evite utilizar un agitador Vórtex®.

3 - Preparación de los patrones de cuantificación para un análisis de cuantificación

Cada análisis de cuantificación que utiliza el kit PLATELIA RABIES II debe incluir 6 patrones de cuantificación de S1 a S6.

El control positivo R4b calibrado (4 EU/ml) corresponde al patrón de cuantificación S6. Las diluciones seriadas del reactivo R4b permiten la preparación de los patrones de cuantificación S5 a S1. Las diluciones se llevan a cabo mediante el diluyente de muestra (reactivo R6).

Patrones de cuantificación		Concentraciones obtenidas por diluciones seriadas del control positivo R4b
S6	R4b diluido a 1/100	4 EU/ml
S5	S6 diluido a 1/2	2 EU/ml
S4	S5 diluido a 1/2	1 EU/ml
S3	S4 diluido a 1/2	0,5 EU/ml
S2	S3 diluido a 1/2	0,25 EU/ml
S1	S2 diluido a 1/2	0,125 EU/ml

6 - ALMACENAMIENTO - PERÍODO DE CONSERVACIÓN

En el momento del suministro, todos los componentes del kit PLATELIA RABIES II se almacenan de +2° a +8°C y se pueden utilizar hasta la fecha de caducidad indicada en el kit. El reactivo R2 (10 X) se puede almacenar de +2°C a +25°C antes de la reconstitución.

	REACTIVO	OBSERVACIONES	PERÍODO DE CONSERVACIÓN
R1	Microplaca	Después de la apertura de la bolsa de aluminio sellada las tiras no utilizadas deben ser devueltas de inmediato a la bolsa, que se sellará de nuevo. El secante debe permanecer en la bolsa de aluminio.	1 mes de +2°C a +8°C
R2	Solución de lavado diluida		2 semanas de +2°C a +8°C
R7	Solución de conjugado diluida	La solución de conjugado diluida debe ser usada de inmediato.	8 horas de +2°C a +8°C
R8 + R9	Solución de desarrollo reconstituida		6 horas a temperatura ambiente (+18°C a +30°C) proteja siempre de la luz

El período de conservación de los reactivos tras la preparación aparece a continuación:

7 - MUESTRAS

- La prueba PLATELIA RABIES II se ha desarrollado para aplicar en suero animal (gatos, perros y zorros).
- El análisis se lleva a cabo en suero después de una dilución 1:100 en reactivo R6.
- Las muestras se almacenan de +2°C a +8°C si la detección se lleva a cabo dentro de las 24 horas o a -20°C durante 6 meses. Las muestras pueden ser sometidas a 3 ciclos de congelación y descongelación. Las muestras previamente congeladas deben ser mezcladas con sumo cuidado después de la descongelación y antes de la prueba.

Nota: Elimine, si es necesario por centrifugación, las partículas de fibrina o agregados en suspensión que puedan proporcionar resultados positivos falsos.

8 - PROTOCOLO DE ENSAYO

Siga estrictamente el protocolo recomendado.

Utilice los controles negativos y positivos para cada prueba realizada y en cada microplaca a fin de validar la calidad de la detección en cada ensayo cualitativo. Si se lleva a cabo la cuantificación, en cada placa habrá que colocar el control negativo y los patrones de cuantificación. En ambos casos, siga la configuración recomendada para la microplaca.

Utilice las buenas prácticas de laboratorio.

1. Retire la cremallera de la microplaca y la cantidad necesaria de filas (R1) del envoltorio protector. Reemplace las filas sin usar con la bolsa desecada en el sobre de la microplaca y ciérrela herméticamente.
2. Establezca con todo cuidado el plan de distribución e identificación de la muestra como se describe a continuación:

Configuración de la microplaca para ensayos cualitativos:												
	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...										

Configuración de la microplaca para ensayos cuantitativos:												
	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. Para la prueba de detección, diluya los controles R3, R4a y R4b y los sueros desconocidos 1:100 en el reactivo R6 (p.ej: 10 µl de la muestra en 990 µl de la solución diluyente).

4. Para la prueba de cuantificación preparar las muestras patrones (ver el capítulo 5.3) y diluir el reactivo R3, los controles R4a y el suero a detectar de 1/100 con el reactivo R6 (por ejemplo 10 µl de la muestra dentro de 990 µl de la solución de dilución).
5. Distribuya 100 µl de muestras diluidas, controles y patrones de cuantificación en los pocillos de la microplaca correspondiente de acuerdo con el plan de distribución preestablecido.
6. Cubra la microplaca con una película autoadhesiva (corte la hoja si es necesario). Oprima firmemente toda la placa para asegurar un sellado perfecto.
7. Incube las tiras a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ durante 60 minutos $\pm$ 5 minutos.
8. Prepare la solución de lavado (R2) [vea el capítulo 5].
9. Prepare la solución de conjugado (R7), tal y como se describe en el capítulo 5 antes del final de la primera incubación.
10. Retire la película adhesiva. Realice 3 ciclos de lavado. Las condiciones óptimas de lavado se obtienen con lavadores de microplacas Bio-Rad PW40, PW41 o 1575 con el programa TSE 3. No permita que la microplaca pase más de 5 minutos después del último ciclo de lavado. Seque por inversión sobre un papel absorbente antes del paso siguiente.
11. Coloque 100 µl de solución conjugada (R7) en cada pocillo. Cubra con una nueva película e incube durante 60 minutos $\pm$ 5 minutos a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
12. Prepare la solución de desarrollo enzimático (R8+R9) tal y como se describe en el capítulo 5 justo antes de usar.
13. Retire la película adhesiva y realice 5 ciclos de lavado. Las condiciones óptimas de lavado se obtienen con lavadores de microplacas Bio-Rad PW40, PW41 o 1575 con el programa TSE 5. No permita que la microplaca pase más de 5 minutos después del último ciclo de lavado. Seque por inversión sobre un papel absorbente antes del paso siguiente.
14. Lejos de la luz directa, distribuya rápidamente 100 µl de la solución de desarrollo enzimático (R8 + R9) en cada pocillo e incube la placa en la oscuridad a temperatura ambiente ($+18$ a $+30^{\circ}\text{C}$) durante 30 minutos $\pm$ 5 minutos.
Nota: No utilice película adhesiva durante esta incubación.
15. Añada 100 µl de solución de parada (R10) en cada pocillo de acuerdo con la misma secuencia y tasa de distribución en lo que se refiere a la solución de revelación.
16. Seque al completo la base de la placa. Lea la densidad óptica a 450 – 620 nm (modo bicromatismo) por medio de un lector de placa dentro de los 30 minutos de interrumpida la reacción (las tiras siempre deben ser mantenidas en la oscuridad antes de la lectura).
17. Antes de registrar los resultados, compruebe que la lectura cumpla con el plan de distribución e identificación de placas y muestras.

PARÁMETROS DE LA LAVADORA PARA MICROPLACAS

NOMBRE: TSE 3

EDIT Mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CROSS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	Nº OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	Nº OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575)	1"8 PW40/1575/28 (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	-	-	-	-	-	30 (PW41) 45 (PW40/1575)	0	-	-
Method 2	-	-	-	BOTTOM ASP.	Plate	Yes	0.3	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0	-	-	-

NOMBRE: TSE 5

EDIT Mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CROSS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	Nº OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	Nº OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat 01 (PW40/PW41) Flat 03 (1575)	1"8 PW40/1575/28 (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	-	-	-	-	-	30 (PW41) 45 (PW40/1575)	0	-	-
Method 2	-	-	-	BOTTOM ASP.	Plate	Yes	0.3	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0	-	-	-

NOMBRE DE LA 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 - CÁLCULO E INTERPRETACIÓN DE LOS RESULTADOS

Los resultados se dan en densidades ópticas (DO) tras leer la microplaca a 450 - 620 nm.

1. Determinación cualitativa

Para la determinación cualitativa incluya en cada prueba los controles (R3, R4a y R4b).

a) Condiciones de la validación

Criterios	Validación
$OD\ R3(i) < 0.05$	La absorbancia de cada control negativo individual debe ser inferior a 0,05. Deberá repetir la prueba si al menos uno de los valores se encuentra fuera de este límite.
$0.300 \leq R4a(i) \leq 1.200$	Todos los valores individuales de DO del control positivo R4a deberán encontrarse entre 0,300 y 1,200. Deberá repetir la prueba si al menos uno de los valores de DO del R4a se encuentra fuera de este límite.
$1.500 \leq R4b(i) \leq 3.500$	Todos los valores individuales de DO del control positivo R4b deberán encontrarse entre 1,500 y 3,500. Sin embargo, un máximo de un valor aberrante individual puede ser eliminado cuando su densidad óptica es inferior a 1,500 o superior a 3,500. La prueba debe ser repetida si la densidad óptica de los dos controles positivos R4b se encuentra fuera de este límite.

b) Interpretación de los análisis

El valor umbral es igual a la media de los dos controles positivos R4a ($\overline{DO\ R4a}$) y corresponde al valor umbral de la seroconversión a 0,5 UE/ml.

El valor de seroconversión elevada es igual a la media de los dos controles positivos R4b ($\overline{DO\ R4b}$) o a un único control positivo R4b si se ha eliminado un valor aberrante. La densidad óptica de cada muestra se compara con el valor de seroconversión elevada y el valor umbral.

2 .

Estado	Resultado	Interpretación
Seroconvertido +++	$DO\ Muestra > \overline{DO\ R4b}$	Las muestras con una densidad óptica superior al valor de seroconversión elevada se originan en individuos con una elevada seroconversión después de la vacunación de acuerdo con la prueba PLATELIA RABIES II.
Seroconvertido	$\overline{DO\ R4a} \leq DO\ Muestra \leq \overline{DO\ R4b}$	Las muestras con una densidad óptica igual o superior a la del valor umbral e igual o inferior a la del valor de seroconversión elevada se originan en individuos que han sufrido seroconversión después de la vacunación de acuerdo con la prueba PLATELIA RABIES II.
No seroconvertido	$DO\ Muestra < \overline{DO\ R4a}$	Las muestras con una densidad óptica inferior al valor umbral se originan en individuos que presentan un nivel de seroconversión insuficiente para evaluar la eficacia de la vacunación de acuerdo con la prueba PLATELIA RABIES II.

Determinación cuantitativa

Para la determinación cuantitativa incluya en cada prueba los controles (S1 a S6, R3 y R4a).

a) Condiciones de la validación

Criterios	Validación
$DO\ R3(i) < 0,05$	La absorbancia de cada control negativo individual debe ser inferior a 0,05. Deberá repetir la prueba si al menos uno de los valores se encuentra fuera de este límite.
$0,300 \leq DO\ R4a(i) \leq 1,200$	Todos los valores individuales del control positivo R4a deberán encontrarse entre 0,300 y 1,200. Deberá repetir la prueba si al menos uno de los valores de la DO del R4a se encuentra fuera de este límite.
$\overline{S1} < \overline{S2} < \overline{S3} < \overline{S4} < \overline{S5} < \overline{S6}$	Calcule la media de DO para S1 a S6 de la manera siguiente: $\overline{S1}$ = media de las dos DO S1 (corresponde a 0,125 UE/ml) $\overline{S2}$ = media de las dos DO S2 (corresponde a 0,25 UE/ml) etc... Las señales de los patrones deben aumentar de la siguiente manera: $\overline{S1} < \overline{S2} < \overline{S3} < \overline{S4} < \overline{S5} < \overline{S6}$.
$0,7 \leq \overline{S3/R4a}\ DO \leq 1,3$	La relación entre $\overline{S3}$ (el valor medio S3) y $\overline{R4a}$ (el valor medio R4a) deberá encontrarse entre 0,7 y 1,3.

b) Interpretación de los análisis

El valor umbral es igual a la media de las dos DO del patrón de cuantificación S3 ($\overline{S3}$) El patrón de cuantificación S3 corresponde al valor umbral de seroconversión a 0,5 UE/ml.

La presencia y cantidad de anticuerpos contra el virus de la rabia en una muestra se determina comparando la densidad óptica de la muestra con una curva estándar.

Los títulos de suero se expresan en unidades equivalentes por ml (UE/ml), unidad equivalente a las unidades internacionales definidas por seroneutralización.

Dibujo de la curva estándar:

Para la reducción manual de datos, usa papel milimetrado y trace los valores medios de la lectura de DO de los patrones de cuantificación (S1 a S6) en el eje vertical (y). Trace las concentraciones correspondientes en UE/ml en el eje horizontal (x). Diseñar unas series de rectas para unir los 6 puntos.

Para la reducción automatizada de datos, se usa una función “punto a punto” para construir una curva a partir de la lectura DO obtenida para los patrones.

Se puede dar un resultado cuantitativo del título de anticuerpos contra el virus de la rabia para una muestra desconocida si el valor DO para la muestra se encuentra entre los valores medios de densidad óptica para S1 (0,125 UE/ml) y S6 (4 UE/ml). En este caso, el título de muestra desconocida se descubre con la curva estándar. En la curva estándar, encuentre el valor correspondiente a la lectura DO de la muestra en el eje y dibuje una línea horizontal en la curva estándar. En el punto de intersección con la curva estándar, dibuje una línea vertical al eje x. Lea la concentración correspondiente en UE/ml.

Si el valor DO de la muestra desconocida es más alto que el valor medio de densidad óptica para el patrón S6, no puede realizarse una cuantificación precisa. Si necesita una cuantificación precisa, proceda a una dilución 1:10 o más de la muestra y realice el ensayo otra vez para conseguir la densidad óptica en el intervalo de la curva estándar.

Nota: una herramienta que permite la interpretación y conversión de la densidad óptica en valores de titulación está disponible previa solicitud (Rabies QT-ELISA BIORAD Vers.200712.A.XLS) para aquellos clientes que no dispongan de un lector Bio-Rad.

Comprensión general de los resultados:

Resultados en densidad óptica para la muestra desconocida	Título para la muestra desconocida (X)	Interpretación del resultado
DO Muestra > $\overline{S6}$	$X > 4$ EU/ml	Nivel elevado de seroconversión. Si se requiere un título preciso, debe diluirse la muestra antes de repetir el análisis.
$\overline{S3} \leq \text{DO Muestra} \leq \overline{S6}$	X en EU/ml (0,5 - 4 EU/ml)	Nivel de seroconversión suficiente.
$\overline{S1} \leq \text{DO Muestra} < \overline{S3}$	X en EU/ml (0,125 - 0,5 EU/ml)	Nivel insuficiente de seroconversión según la prueba PLATELIA RABIES II.
DO Muestra < $\overline{S1}$	-	No se ha detectado seroconversión.

10 - LIMITACIONES DE LA PRUEBA

Podemos encontrar una seroconversión no suficiente o no detectable en animales recién vacunados debido a una respuesta inmunológica tardía.

Al igual que el método de titulación oficial de anticuerpos neutralizantes y según las regulaciones (EC)N°998/2003 con fecha del día 3 de julio del 2004, la prueba PLATELIA RABIES II debe realizarse en muestras que hayan sido tomadas con un mínimo de 30 días después de la vacunación.

11 - EQUIPO Y MATERIALES REQUERIDOS Y NO SUMINISTRADOS

Equipo

- Lector de microplacas equipado con filtros de 450 nm y 620 nm (*)
- Incubador para microplacas configurado a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Lavador para microplacas manual, semiautomático o automático (*)
- Mezclador Vórtex®.

(*) *Contáctenos si desea conseguir más información sobre los instrumentos Bio-Rad validados por nuestros departamentos técnicos.*

Material

- Pipetas o micropipetas automáticas o semiautomáticas, ajustables o preconfiguradas, para medir y administrar 10 a 1000 μl y 1, 2 y 10 ml.
- Cilindros graduados con capacidad de 25 ml, 50 ml, 100ml y 1.000ml.
- Tubos desechables.
- Agua destilada o desionizada.
- Hipoclorito sódico (lejía).
- Papel absorbente.
- Gafas de seguridad.
- Guantes de látex desechables.
- Envase para desechos biopeligrosos.

12 - PRECAUCIONES

1. Precauciones

La fiabilidad de los resultados depende de la correcta aplicación de las siguientes buenas prácticas de laboratorio:

- Guarde los reactivos a una temperatura de $+2^{\circ}\text{C}$ a $+8^{\circ}\text{C}$.
- No utilice reactivos caducados.
- No mezcle reactivos de lotes distintos dentro de un ciclo de prueba determinado a excepción de los reactivos R2, R8, R9, R10.
- Antes de usar, espere 30 minutos para que los reactivos se ajusten a la temperatura ambiente.
- Reconstituya al completo los reactivos para evitar contaminación.
- No lleve a cabo la prueba en presencia de vapores reactivos (ácidos, alcalinos, vapores aldehídos) o polvo que podrían alterar la actividad enzimática del conjugado.
- Utilice artículos de vidrio de laboratorio cuidadosamente lavados y enjuagados con agua desionizada o, preferiblemente, utilice material desechable.
- No permita que pasen más de 5 minutos entre la última operación de lavado y la distribución del reactivo.

- Compruebe la precisión de las pipetas y el correcto funcionamiento del aparato utilizado.
- No utilice el mismo envase para distribuir conjugado y solución de desarrollo.
- La reacción enzimática es muy sensible al metal o iones metálicos. En consecuencia, no permita que elementos metálicos entren en contacto con los distintos conjugados o la solución sustrato.
- La solución de desarrollo (tampón sustrato + cromógeno) debe ser incolora. La aparición de color azul a los pocos minutos de la reconstitución de la solución de revelado indica que el reactivo no puede ser usado y debe reemplazarse. La preparación de esta solución puede hacerse en una bandeja de plástico desechable limpia o envase de vidrio que primero ha sido lavado con HCl 1N, enjuagado cuidadosamente con agua destilada y secado. Almacene la solución en un lugar oscuro.
- Utilice una punta de pipeta nueva para cada muestra.
- No varíe el procedimiento del ensayo.
- El lavado de los pocillos es un paso crítico del procedimiento: respete el número recomendado de ciclos de lavado y asegúrese que todos los pocillos estén totalmente llenos y que luego se vacíen. Un lavado inadecuado podrá causar resultados incorrectos.

2. Instrucciones de salud e higiene

Por lo general, las condiciones higiénicas, medidas de bioseguridad y las buenas prácticas de laboratorio deberán ponerse en práctica de acuerdo con las regulaciones de su país. Todos los reactivos están previstos para diagnóstico veterinario in vitro de sueros de gatos, perros y zorros.

- Utilice guantes desechables cuando manipule reactivos y muestras. Lávese las manos a conciencia tras manipular muestras y reactivos.
- No meta la pipeta en la boca.
- Considere todo material directamente en contacto con las muestras y los reactivos, así como las soluciones de lavado, como material infeccioso.
- Evite derramar muestras o soluciones que contengan muestras.
- Los derrames pueden ser enjuagados con lejía diluida con cloro al 10%. Si el líquido contaminante es ácido, los derrames deben ser neutralizados inicialmente con bicarbonato sódico, limpiados con lejía y secados con papel absorbente. El material utilizado para la limpieza debe ser desechado después de la descontaminación.
- Las muestras y material y productos contaminados deben ser desechados después de la descontaminación:
 - ya sea por inmersión en lejía a una concentración final de hipoclorito sódico al 5% durante 30 minutos;
 - o por autoclave a 121°C durante 2 horas mínimo.

Atención: No introduzca soluciones con hipoclorito sódico en el autoclave.

- Los materiales químicos se deben utilizar y desechar de acuerdo con las buenas prácticas de laboratorio.
- Para más información acerca de las recomendaciones relacionadas con algunos componentes químicos de este kit de prueba, consultar los pictograma(s) de las etiquetas y la información proporcionada al final de las instrucciones de uso. Podrá consultar la Hoja de datos de seguridad de materiales en www.bio-rad.com.

13 - LITERATURA

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 J.L. , BLANCHARD I., BOURHY H. 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 g-globulin. *J. Immunol.* 97, 822-827.
17. GRASSI M., WANDELER A.I., 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-PAVLINIC M., HOSTNIK P., LEVICNIK-STEZINAR S., ZALETEL-KRAGELJ 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 K.J., 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.

PLATELIA RABIES II

Ad Usum Veterinarium

 192

REF 3550180

KIT PER RILEVAZIONE E TITOLAZIONE *IN VITRO* DELLA GLICOPROTEINA IgG DEL VIRUS RABBIA NEL SIERO DI CANI, GATTI E VOLPI.

Tutti i reagenti prodotti e commercializzati sono sottoposti ad un sistema di qualità completo dalla ricezione delle materie prime fino alla commercializzazione finale del prodotto.

Ogni lotto è sottoposto ad un controllo qualità ed è immesso sul mercato se conforme ai criteri di accettazione.

 2023/10

BIO-RAD

INDICE

- 1 - USO PREVISTO
- 2 - INTERESSE DEL KIT PLATELIA RABIES II
- 3 - PRINCIPIO DEL TEST PLATELIA RABIES II
- 4 - COMPOSIZIONE DEL KIT PLATELIA RABIES II
- 5 - PREPARAZIONE DEI REAGENTI
- 6 - CONSERVAZIONE - DURATA DEL PRODOTTO
- 7 - CAMPIONI
- 8 - PROTOCOLLO DI ANALISI
- 9 - CALCOLO ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI
- 10 - LIMITI DEL TEST
- 11 - STRUMENTAZIONE E MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI
- 12 - PRECAUZIONI
- 13 - LETTERATURA

1 - USO PREVISTO

Il kit PLATELIA RABIES II è un test diagnostico ELISA *in-vitro* che consente di rilevare e titolare la glicoproteina IgG del virus rabbia nel siero di cani, gatti e volpi.

2 - INTERESSE DEL KIT PLATELIA RABIES II

La rabbia è una delle più vecchie malattie virali che colpisce gli esseri umani e gli animali. Il virus della rabbia è un virus elevatamente neurotrofo, che causa nei mammiferi un'encefalite dalle conseguenze solitamente fatali. Il virus viene prevalentemente trasmesso tramite la saliva attraverso morsi di animali idrofobi. I programmi d'immunizzazione e di controllo per la tutela della popolazione animale dal virus della rabbia hanno dato luogo all'eradicazione della malattia in vari paesi dell'Europa occidentale ed in alcuni dell'America del sud.

Il 3 luglio 2004, un nuovo regolamento europeo si applica ai movimenti internazionali di carnivori domestici dai paesi infestati dalla rabbia ai paesi liberi da questa malattia. I carnivori domestici possono viaggiare se il loro siero contiene almeno 0,5 IU/ml (International Units/ml) di anticorpi per la neutralizzazione della rabbia.

La titolazione degli anticorpi antirabbici ha varie applicazioni pratiche:

- Sierologia individuale per scopi commerciali internazionali: gli anticorpi antirabbici sono misurati in laboratori specializzati per determinare il grado d'immunità degli animali vaccinati (gatti e cani). Un livello di anticorpi uguale o superiore a 0,5 IU/ml viene considerato dagli esperti dell'OIE (Ufficio Internazionale delle Epizootie) come un accettabile livello di sieroconversione al di sopra del quale la vaccinazione può essere ritenuta un'adeguata protezione.
- Conferma dello stato di vaccinazione durante una campagna di vaccinazione: il controllo degli anticorpi antirabbici permette di valutare in modo indiretto l'efficacia della campagna di vaccinazione orale della fauna selvatica (volpi).

3 - PRINCIPIO DEL TEST PLATELIA RABIES II

PLATELIA RABIES II è una tecnica immuno-enzimatica per la rilevazione degli anticorpi contro la glicoproteina del virus della rabbia. Questo test può essere fatto sul siero di varie specie di animali: cani, gatti e volpi.

Il test si basa sull'uso di una consolidata tecnica immunologica conosciuta con il nome di ELISA indiretto. Una micropiastra viene ricoperta con la glicoproteina della rabbia estratta dalla membrana del virus disattivata e purificata. Il coniugato enzimatico consiste di una proteina A proveniente da uno *Staphylococcus aureus* associata a perossidasi. I controlli positivi, calibrati con gli standard OIE, permettono di determinare la presenza a livello qualitativo e quantitativo di anticorpi antirabbia nel siero.

Il test comprende le seguenti fasi di reazione:

- 1 - I sieri da identificare così come i controlli positivi calibrati o gli standard di quantificazione vengono distribuiti nei pozzetti della micropiastra ricoperti di glicoproteina. Durante l'incubazione di un'ora a 37°C, gli anticorpi antirabbici presenti nel campione si legano alla glicoproteina che ricopre i pozzetti della micropiastra. Dopo l'incubazione, gli anticorpi non legati ed le altre proteine del siero vengono rimossi tramite lavaggi.

- 2 - Il coniugato (proteina A legata alla perossidasi) viene aggiunto ai pozzetti della micropiastra. Durante una seconda incubazione di un'ora a 37°C, la proteina A etichettata si lega ai complessi dell'antigene dell'anticorpo antirabbico attaccati ai pozzetti della micropiastra. Il coniugato non legato viene rimosso tramite lavaggi.
- 3 - La presenza del complesso antigene/anticorpo viene rivelata con l'aggiunta di una soluzione che contiene un substrato per la perossidasi ed un cromogeno, promuovendo una reazione di tipo colorimetrico.
- 4 - Dopo 30 min. di incubazione a temperatura ambiente, la reazione enzimatica viene interrotta aggiungendo acido solforico H_2SO_4 1N. La lettura delle densità ottiche ottenute con uno spettrofotometro impostato a 450 - 620 nm è proporzionale agli anticorpi antirabbici presenti nei campioni. Viene quindi disegnata una curva standard utilizzando gli standard di quantificazione (da S1 a S6), ottenuta con diluizioni seriali del controllo positivo calibrato R4b.

4 - COMPOSIZIONE DEL KIT PLATELIA RABIES II

Tutti i reagenti sono destinati esclusivamente ad un utilizzo veterinario *in vitro*.

Sono forniti reagenti sufficienti per 2 x 96 test. Su ogni micropiastro, possono essere analizzati 90 campioni se viene effettuato un test qualitativo. Se viene utilizzato un sistema di quantificazione possono essere quantificati fino a 80 campioni espressamente per anticorpi antirabbici.

ETICHETTATURA	TIPO DI REAGENTE	PRESENTAZIONE
R1	Micropiastro: 12 strisce di 8 pozzetti sensibilizzati con la glicoproteina del virus della rabbia.	2 piastre
R2	Soluzione di lavaggio: buffer concentrato 10-volte Tris-NaCl Conservante: ProClin™ 300 (0,01%)	1 bottiglia (250 ml)
R3	Controllo negativo: Controllo non reattivo TRIS-EDTA Conservante: ProClin™ 300 (0,1%)	1 fiala (0,6 ml)
R4a	0,5 EU/ ml controllo positivo: controllo positivo calibrato 0,5 EU/ml Tampone glicina contenente BSA e (serio di cani con IgG anti-rabbia). Colore giallo. Conservante ProClin™ 300 (0,1%)	1 fiala (0,6 ml)
R4b	4 EU/ ml controllo positivo: controllo positivo calibrato 4 EU/ml Tampone glicina contenente BSA e (and dog serum with anti-rabies IgG). Colore blu. Conservante ProClin™ 300 (0,1%)	1 fiala (0,6 ml)
R6	Diluente campioni: Tampone TRIS - EDTA pronto all'uso per la diluizione dei campioni. Colore rosso. Conservante: ProClin™ 300 (0,1%)	2 fiale (2 x 125 ml)
R7	Coniugato : Soluzione contenente il complesso proteina A – Perossidasi e proteina bovina purificata. Concentrato 10 volte. Colore verde. Conservante: ProClin™ 300 (0,1%)	1 fiala (3 ml)
R8	Buffer del substrato della perossidasi: soluzione di acido citrico e acetato di sodio contenente 0,015% H ₂ O ₂ e 4% dimetilsolfossido (DMSO)	1 fiala (60 ml)
R9	Cromogeno: soluzione TMB Tetrametilbenzidina 0,25%	1 fiala (5 ml)
R10	Soluzione di stop: soluzione di acido solforico 1 N	1 fiala (28 ml)
	Pellicole adesive per micropiastre	6

5 - PREPARAZIONE DEI REAGENTI

Nota :

Prima dell'uso consentire ai reagenti di raggiungere la temperatura ambiente (+18°C / + 30°C) per 30 minuti.

Omogenizzare i reagenti capovolgendoli prima dell'apertura.

1 - Reagenti pronti per l'uso

• Microplaques (R1)

Prima dell'uso, consentire alla micropiastra di adattarsi alla temperatura ambiente (+18°C / +30°C) nel suo imballaggio di protezione per evitare che si formi condensa d'acqua nei pozzetti. Riporre immediatamente le strip non utilizzate nella busta, chiudere bene la busta dopo aver espulso tutta l'aria, quindi conservare ad una temperatura compresa tra +2°C e +8°C.

• Diluente per i campioni (R6)

• Soluzione di stop (R10)

2 - Reagenti da ricostituire

• Soluzione di lavaggio (R2)

Diluire la soluzione 1/10 in acqua distillata (esempio 100 ml di reagente R2 in 900 ml di acqua distillata). Per una piastra sono necessari 500 ml.

• Controllo negativo (R3)

Diluire la soluzione 1/100 in R6.

• 0,5 EU/ ml controllo positivo (R4a)

Diluire la soluzione 1/100 in R6

• 4 EU/ ml controllo positivo (R4b)

Diluire la soluzione 1/100 in R6

• Coniugato (R7)

La soluzione è concentrata 10 volte. Per preparare la soluzione di coniugato, aggiungere 1 volume di coniugato concentrato a 9 volumi di soluzione di lavaggio 1X (R2). Per una micropiastra intera sono necessari 11 ml.

• Soluzione di rivelazione enzimatica (R8 + R9)

Diluire il reagente R9 1/11 nel reagente R8 (esempio: 0,1 ml di reagente R9 in 1 ml di reagente R8) tenendo presente che 11 ml di soluzione di rivelazione enzimatica sono sufficienti per 1 micropiastra.

Omogenizzare con delicatezza. Evitare l'utilizzo di un agitatore Vortex®.

3 - Preparazione degli standard di quantificazione per un test di quantificazione

Ogni test di quantificazione effettuato con il kit PLATELIA RABIES II dovrebbe comprendere 6 standard di quantificazione – da S1 ad S6.

Il controllo positivo calibrato R4b (4 EU/ml) corrisponde allo standard di quantificazione S6.

Le diluizioni seriali a partire dal R4b consentono la preparazione degli standard di quantificazione da S5 a S1. Le diluizioni sono effettuate utilizzando il diluente per i campioni (reagente R6).

Standard di quantificazione		Concentrazioni ottenute attraverso le diluizioni seriali del controllo positivo R4b
S6	R4b diluito 1/100	4 EU/ml
S5	S6 diluito 1/2	2 EU/ml
S4	S5 diluito 1/2	1 EU/ml
S3	S4 diluito 1/2	0,5 EU/ml
S2	S3 diluito 1/2	0,25 EU/ml
S1	S2 diluito 1/2	0,125 EU/ml

6 - CONSERVAZIONE – DURATA DEL PRODOTTO

Una volta forniti, tutti i componenti del kit PLATELIA RABIES II devono essere conservati ad una temperatura compresa tra +2°C e +8°C; il kit può essere utilizzato fino alla data di scadenza indicata. Il reagente R2 (10 X) può essere conservato tra +2°C e +25°C prima di essere ricostituito.

La durata dei reagenti dopo la preparazione è la seguente:

	REAGENTE	OSSERVAZIONI	DURATA DEL PRODOTTO
R1	Micropiastra	Dopo l'apertura della confezione sigillata di alluminio, le strisce non utilizzate dovrebbero essere riposte immediatamente nella confezione che dovrebbe essere sigillata di nuovo. Il dissecante dovrebbe rimanere nella confezione di alluminio.	1 mese ad una temperatura compresa tra +2°C e +8°C
R2	Soluzione di lavaggio diluita		2 settimane ad una temperatura compresa tra +2°C e +8°C
R7	Coniugato diluito	Se possibile, la soluzione coniugata diluita dovrebbe essere utilizzata immediatamente.	8 ore ad una temperatura compresa tra +2°C e +8°C
R8 + R9	Soluzione di sviluppo ricostituita		6 ore a temperatura ambiente (tra +18°C e +30°C) sempre al riparo dalla luce

7 - CAMPIONI

- Il test PLATELIA RABIES II è stato messo a punto per essere applicato su siero di animali (cani, gatti, volpi).
- Il test viene eseguito su sieri dopo una diluizione 1/100 nel reagente R6.
- I campioni possono essere conservati ad una temperatura compresa tra +2°C e +8°C se la rilevazione viene effettuata entro le 24 ore oppure possono essere conservati a -20°C per 6 mesi. I campioni possono essere sottoposti a 3 cicli di congelamento e o scongelamento. I campioni precedentemente congelati dovrebbero essere miscelati con attenzione dopo lo scongelamento in previsione di un test.

NB: eliminare, se necessario tramite centrifugazione, le particelle di fibrina o gli aggregati in sospensione che possono dar luogo a dei falsi positivi.

8 - PROTOCOLLO DI ANALISI

Seguire strettamente il protocollo raccomandato.

Usare i controlli negativi e positivi su ogni micropiastra per ogni ciclo di test e per convalidare la qualità della rivelazione in ogni test qualitativo. Se viene effettuata la quantificazione, il controllo negativo e gli standard di quantificazione dovrebbero essere depositati su ogni piastra. In entrambi i casi, seguire l'impostazione consigliata per la micropiastra.

Applicare le buone pratiche di laboratorio.

1. Rimuovere il supporto della micropiastra ed il numero necessario di strisce (R1) dall'imballaggio di protezione. Rimettere le strisce non utilizzate con la bustina dessiccante nell'imballaggio della micropiastra e chiuderlo ermeticamente.
2. Definire con attenzione la distribuzione dei campioni ed il piano d'identificazione come segue:

Impostazione della micropiastra per il test qualitativo:												
	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...										

Impostazione della micropiastra per il test quantitativo:												
	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. Per il metodo qualitativo, diluire i controlli R3, R4a e R4b ed i sieri sconosciuti a 1/100 nel reagente R6 (Ex.: 10 µl di campione in 990 µl di soluzione diluente).

4. Per il metodo quantitativo preparare la gamma di quantificazione (vedi capitolo 5.3) e diluire i controlli negativi R3 e positivi R4a nonché i campioni da analizzare al 1/100e nel reattivo R6 (per es. 10 µl del campione in 990 µl di soluzione di diluizione).
5. Distribuire 100 µl di campioni diluiti, controlli e standard di quantificazione nei pozzetti della micropiastra secondo il piano di distribuzione predefinito.
6. Coprire la micropiastra con una pellicola adesiva (tagliarla se necessario). Premere con decisione su tutta la piastra per garantire una chiusura sigillata.
7. Incubare le strisce a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ per 60 minuti $\pm$ 5 minuti.
8. Preparare la soluzione di lavaggio (R2) [far riferimento al capitolo 5].
9. Preparare la soluzione di coniugato (R7), come descritto nel capitolo 5 prima della fine della prima incubazione.
10. Rimuovere la pellicola adesiva. Effettuare 3 cicli di lavaggio. Le condizioni di lavaggio ottimali sono ottenute con i lavatori di piastra PW40, PW41 o 1575 Bio-Rad con il programma TSE 3. Non lasciar riposare la micropiastra per più di 5 minuti dopo l'ultimo ciclo di lavaggi. Asciugare per inversione su carta assorbente prima di eseguire le fasi successive.
11. Distribuire 100 µl della soluzione di coniugato (R7) in ogni pozzetto. Coprire con una nuova pellicola adesiva ed incubare per 60 minuti $\pm$ 5 minuti a $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$.
12. Preparare la soluzione di rivelazione enzimatica (R8+R9) come descritto nel capitolo 5, immediatamente prima dell'uso.
13. Rimuovere la pellicola adesiva, effettuare 5 cicli di lavaggi. Le condizioni di lavaggio ottimali sono ottenute con lavatori di piastra PW40, PW41 o 1575 Bio-Rad con il programma TSE 5. Non lasciar riposare la micropiastra per più di 5 minuti dopo l'ultimo ciclo di lavaggio. Asciugare per inversione su carta assorbente prima di effettuare le fasi successive.
14. Al riparo dalla luce, distribuire rapidamente 100 µl della soluzione di rivelazione enzimatica (R8 + R9) in ogni pozzetto ed incubare la piastra in un luogo oscuro e a temperatura ambiente (tra $+18^{\circ}\text{C}$ e $+30^{\circ}\text{C}$) per 30 minuti $\pm$ 5 minuti.
NB: non utilizzare la pellicola adesiva durante questa incubazione.
15. Aggiungere 100µl della soluzione di stop (R10) ad ogni pozzetto utilizzando la stessa sequenza e lo stesso ritmo di distribuzione come fatto per la soluzione di rivelazione.
16. Pulire con attenzione la parte inferiore della piastra. Leggere la densità ottica a 450 nm - 620 nm (modalità bicromatica) entro 30 minuti dalla fine della reazione (le strisce dovrebbero sempre essere tenute lontano dalla luce prima della lettura).
17. Prima di registrare i risultati controllare che la lettura sia conforme con il piano di distribuzione ed identificazione per le piastre ed i campioni.

PARAMETRI PER I LAVATORI DI MICROPIASTRA

NOME: TSE 3

EDIT Mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CROSS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	N° OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	N° 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	-	-	-	-	-	30 (PW41) 45 (PW40/1575)	0	-	-
Method 2	-	-	-	BOTTOM ASP.	Plate	Yes	0.3	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0	-	-	-

NOME: TSE 5

EDIT Mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CROSS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	N° OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	N° 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	-	-	-	-	-	30 (PW41) 45 (PW40/1575)	0	-	-
Method 2	-	-	-	BOTTOM ASP.	Plate	Yes	0.3	-	-	-	-	-	-	1	-	1	0	-	-	-

NOME DELLA PIASTRA: 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 - CALCOLO ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

I risultati sono forniti in densità ottica (DO) dopo la lettura della micropiastra a 450 - 620 nm.

1. Determinazione qualitativa

Per la determinazione qualitativa, includere tutti i controlli (R3, R4a e R4b) per ogni analisi effettuata.

a) Condizioni di validazione

Criteri	Validazione
$DO\ R3(i) < 0,05$	L'assorbanza di ogni controllo negativo individuale deve essere inferiore allo 0,05. Il test deve essere ripetuto se anche un solo valore di DO di R3 si situa al di fuori di questo limite.
$0,300 \leq DO\ R4a(i) \leq 1,200$	Ogni valore individuale di DO del controllo positivo R4a deve essere compreso tra 0,300 e 1,200. Il test deve essere ripetuto se anche un solo valore di DO di R4a si situa al di fuori di questo limite.
$1,500 \leq DO\ R4b(i) \leq 3,500$	Ogni valore individuale di DO del controllo positivo R4b deve essere compreso tra 1,500 e 3,500. Tuttavia un massimo di un valore aberrante individuale può essere eliminato quando la sua densità ottica è inferiore a 1,500 o superiore a 3,500. Il test deve essere ripetuto se le DO dei due controlli positivi R4b si situano al di fuori di questo limite.

b) Interpretazione dei risultati

Il Valore Soglia è uguale alla media dei due controlli positivi R4a ($\overline{DO\ R4a}$) e corrisponde al valore della soglia di sieroconversione a 0,5 EU/ml.

Un valore di sieroconversione elevato è uguale alla media dei due controlli positivi R4b ($\overline{DO\ R4b}$) oppure al singolo controllo positivo R4b in caso di eliminazione di un valore aberrante.

La densità ottica di ogni campione è paragonata a questa sieroconversione elevata e a questo Valore Soglia.

Status	Risultato	Interpretazione
Sieroconvertito +++	$\overline{DO\ campione} > \overline{DO\ R4b}$	Campioni con dei valori di DO superiori al valore di sieroconversione elevata originato dagli individui fortemente sieroconvertiti dopo la vaccinazione secondo il test PLATELIA RABIES II.
Sieroconvertito	$\overline{DO\ R4a} \leq \overline{DO\ campione} \leq \overline{DO\ R4b}$	Campioni con il valore di DO superiore o uguale al Valore Soglia e inferiore o uguale al valore di sieroconversione elevata originato dagli individui sieroconvertiti dopo la vaccinazione secondo il test PLATELIA RABIES II.
Non sieroconvertito	$\overline{DO\ campione} < \overline{DO\ R4a}$	Campioni con un valore di DO inferiore al Valore Soglia originato da individui che presentano un livello di sieroconversione insufficiente per valutare l'efficacia della vaccinazione secondo il test PLATELIA RABIES II.

2. Determinazione quantitativa

Per la determinazione quantitativa, includere tutti gli standard ed i controlli (da S1 ad S6, R3 ed R4a) per ogni analisi effettuata.

a) Condizioni di validazione

Criteri	Validazioni
$DO\ R3(i) < 0,05$	L'assorbanza di ogni controllo negativo individuale deve essere inferiore allo 0,05. Il test deve essere ripetuto se anche un solo valore si situa al di fuori di questo limite.
$0,300 \leq DO\ R4a(i) \leq 1,200$	Ogni valore individuale delle densità ottiche del controllo positivo R4a deve essere compreso tra 0,300 e 1,200. Il test deve essere ripetuto se anche uno solo dei valori di DO di R4a si situa al di fuori di questo limite.
$\overline{S1} < \overline{S2} < \overline{S3} < \overline{S4} < \overline{S5} < \overline{S6}$	Calcolare la media delle DO per S1 fino ad S6 nel modo seguente: $\overline{S1}$ = media delle due DO di S1 (corrisponde a 0,125 EU/ml) $\overline{S2}$ = media delle due DO di S2 (corrisponde a 0,25 EU/ml) ecc... I segnali degli standard devono aumentare nel seguente modo: $\overline{S1} < \overline{S2} < \overline{S3} < \overline{S4} < \overline{S5} < \overline{S6}$.
$0,7 \leq \overline{S3/R4a} \leq 1,3$	Il rapporto tra $\overline{S3}$ (media dello standard S3) ed $\overline{R4a}$ (media di R4a) deve essere compresa tra 0,7 ed 1,3.

b) Interpretazione dei risultati

Il Valore Soglia è uguale alla media delle due DO dello standard di quantificazione S3 ($\overline{S3}$). Lo standard di quantificazione S3 corrisponde al valore della soglia di sieroconversione di 0,5 EU/ml.

La quantità di anticorpi antirabbici in un campione è determinata paragonando la densità ottica del campione con una curva standard.

Le titolazioni di siero sono espresse come unità equivalenti per ml (EU/ml), unità equivalenti alle unità internazionali definite dalla sieroneutralizzazione.

Tracciare la curva standard:

Per la riduzione manuale dei dati, utilizzare carta millimetrata e segnare i valori medi delle letture ottiche DO degli standard di quantificazione (da S1 ad S6) sugli assi delle ordinate (y). Segnare le concentrazioni corrispondenti in EU/ml sull'asse delle ascisse (x). Tracciare dei segmenti di linea che passano da questi 6 punti per ottenere una curva di riferimento.

Per la riduzione automatica dei dati, utilizzare la funzione "punto per punto" per costruire una curva dalle letture DO ottenute per gli standard.

Un risultato quantitativo per la titolazione degli anticorpi antirabbici per un campione sconosciuto può essere ottenuto se il valore DO per il campione si situa tra i valori di densità media di S1 (0,125 EU/ml) e di S6 (4 EU/ml). In questo caso, la titolazione del campione sconosciuto è determinata utilizzando la curva standard. Su tale curva individuare il valore corrispondente alla lettura DO del campione sull'asse delle y e disegnare una riga orizzontale rispetto alla curva standard. Al punto di intersezione con la curva standard, tracciare una linea verticale rispetto all'asse delle x. Leggere la concentrazione corrispondente in EU/ml.

Se il valore DO del campione sconosciuto è superiore rispetto al valore medio di densità ottica per lo standard S6, non può essere effettuata una quantificazione precisa. Se è necessaria una quantificazione precisa, procedere con una diluizione 1/10 o superiore del campione ed effettuare nuovamente il test per disporre di un valore di densità ottica nell'intervallo della curva standard.

Nota: uno strumento di interpretazione e di conversione dei DO in titolazione è disponibile su richiesta (Rabies QT-ELISA BIORAD-Vers.200712 A.XLS) per gli utenti non provvisti di un lettore Bio-Rad.

Interpretazione generale dei risultati:

Risultati in densità ottica per il campione sconosciuto	Titolazione per il campione sconosciuto (X)	Interpretazione del risultato
$DO \text{ campione} > \overline{S6}$	$X > 4 \text{ EU/ml}$	Livello di sieroconversione elevato. Se si richiede una titolazione precisa, il campione deve essere diluito prima di ripetere il test.
$\overline{S3} \leq DO \text{ campione} \leq \overline{S6}$	$X \text{ in EU/ml (0,5 - 4 EU/ml)}$	Livello di sieroconversione sufficiente.
$\overline{S1} \leq DO \text{ campione} < \overline{S3}$	$X \text{ in EU/ml (0,125 - 0,5 EU/ml)}$	Livello di sieroconversione insufficiente secondo il test PLATELIA RABIES II.
$DO \text{ campione} < \overline{S1}$	-	Nessuna sieroconversione rilevabile.

10 - LIMITI DEL TEST

Negli animali vaccinati di recente possiamo osservare una sieroconversione insufficiente o impercettibile dovuta a un ritardo insufficiente d'immunizzazione.

Come per il metodo di riferimento e in conformità alla regolamentazione CE n° 998/2003 del 26 maggio 2003, il prelievo dev'essere effettuato minimo 30 giorni dopo il vaccino.

11 - STRUMENTAZIONE E MATERIALI RICHIESTI MA NON FORNITI

Strumentazione

- Lettore di micropiastra fornito di filtri 450 e 620 nm (*).
- Incubatore della micropiastra impostato a $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Dispositivo manuale per il lavaggio della piastra, semi-automatico o automatico (*).
- Vortex® mixer.

(* Consultateci per informazioni dettagliate sull'attrezzatura consigliata dal nostro dipartimento tecnico.

Materiale

- Pipette automatiche o semi automatiche regolabili o presettate o micropipette per effettuare test dai 10 ai 1000 µl e 1, 2 e 10 ml.
- Cilindri graduati di 25 ml, 50 ml, 100 ml, e di 1 000 ml di capacità.
- Provette usa e getta.
- Acqua distillata o deionizzata.
- Ipocloruro di sodio (candeggina).
- Carta assorbente.
- Occhiali di protezione o di sicurezza.
- Guanti usa e getta di latex.
- Contenitore per rifiuti biologici pericolosi.

12 - PRECAUZIONI

1. Precauzioni

La qualità dei risultati dipende dall'applicazione corretta delle seguenti buone pratiche di laboratorio:

- I reagenti devono essere conservati ad una temperatura compresa tra $+2^{\circ}\text{C}$ e $+8^{\circ}\text{C}$.
- Non utilizzare reagenti scaduti.
- Non miscelare reagenti provenienti da lotti diversi nel corso di un determinato test ad eccezione di reagenti generici R2, R8, R9, R10.
- Prima dell'uso, attendere 30 minuti per consentire ai reagenti di adattarsi alla temperatura del laboratorio.
- Ricostituire con attenzione i reagenti evitando qualsiasi contaminazione.
- Non effettuare il test in presenza dei vapori reattivi (vapori acidi, alcalini e di aldeide) oppure di polveri che potrebbero alterare l'attività enzimatica del coniugato.
- Utilizzare protezioni per gli occhi attentamente lavate e sciacquate con acqua deionizzata o, preferibilmente, materiale usa e getta.
- Non lasciar riposare la micropiastra per più di 5 minuti tra la fine dell'operazione di lavaggio e la distribuzione dei reagenti.
- Controllare l'accuratezza delle pipette ed il buon funzionamento delle apparecchiature utilizzate.

- Non utilizzare mai lo stesso contenitore per distribuire il coniugato e la soluzione di rivelazione.
- La reazione enzimatica è molto sensibile ai metalli e agli ioni metallici. Di conseguenza evitare il contatto di elementi di metallo con il coniugato o la soluzione di substrato.
- La soluzione di rivelazione enzimatica (buffer del substrato + cromogeno) deve essere incolore. L'apparire di una colorazione blu dopo alcuni minuti dalla la ricostituzione della soluzione di rivelazione, indica che il reagente non può essere utilizzato e che deve quindi essere sostituito. La preparazione di questa soluzione può essere fatta in una vaschetta di plastica monouso pulita oppure in un contenitore di vetro che sia stato lavato con 1N HCl e sciacquato attentamente con acqua distillata e poi asciugato. Conservare la soluzione al riparo dalla luce.
- Utilizzare un puntale di pipetta pulito per ogni campione.
- Non cambiare la procedura di campionamento.
- Il lavaggio della micropiastre è una fase fondamentale della procedura: rispettare il numero consigliato di cicli di lavaggio ed assicurarsi che tutti i pozzetti siano riempiti e poi svuotati. Un risciacquo inadeguato può dar luogo a risultati scorretti.

2. Istruzioni per la salute e la sicurezza

In generale, le condizioni d'igiene, le misure di biosicurezza e le buone pratiche di laboratorio devono essere conformi con le raccomandazioni delle autorità competenti del paese.

Tutti i reagenti del kit sono destinati all'uso nella diagnostica veterinaria "in vitro" - sieri di cani, gatto e volpi.

- Indossare guanti usa e getta quando si toccano i reagenti e campioni. Sciacquarsi con cura le mani dopo aver maneggiato i campioni ed i reagenti.
- Non pipettare con la bocca.
- Considerare come infetto qualsiasi tipo di materiale direttamente in contatto con i campioni, i reagenti e le soluzioni di lavaggio.
- Evitare di versare campioni o soluzioni che contengono campioni.
- Eventuali perdite possono essere sciacquate con candeggina diluita al 10% di Chl. Se il fluido contaminante è acido, le perdite devono essere inizialmente neutralizzate con del bicarbonato di sodio, poi pulite con candeggina e asciugate con della carta assorbente. Il materiale utilizzato per pulire deve essere gettato dopo la decontaminazione.
- I campioni, il materiale ed i prodotti contaminati dovrebbero essere smaltiti dopo la decontaminazione:
 - tramite immersione in candeggina alla concentrazione finale del 5% di ipocloruro di sodio per 30 min.
 - oppure tramite sterilizzazione in autoclave a 121°C per almeno 2 ore.

Avvertenza: non introdurre le soluzioni che contengono ipocloruro di sodio nell'autoclave.

- I prodotti chimici dovrebbero essere utilizzati e smaltiti in conformità con le buone pratiche di laboratorio.
- Per le raccomandazioni su precauzioni e rischi correlati ad alcuni componenti chimici del presente kit, consultare i simboli riportati sulle etichette e le informazioni fornite alla fine delle istruzioni per l'uso. La Scheda di Sicurezza è disponibile su www.bio-rad.com.

13 - LETTERATURA

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 J.L. , BLANCHARD I., BOURHY H. 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 g-globulin. *J. Immunol.* 97, 822-827.
17. GRASSI M., WANDELER A.I., 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-PAVLINIC M., HOSTNIK P., LEVICNIK-STEZINAR S., ZALETEL-KRAGELJ 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 K.J., 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.

PLATELIA RABIES II

Ad Usum Veterinarium

 192

REF 3550180

KIT ZUM *IN-VITRO* NACHWEIS UND ZUR TITRIERUNG VON IGG ANTI-TOLLWUT VIRUS GLYCOPROTEIN IN SERUM VON HUNDEN, KATZEN UND FÜCHSEN.

Alle hergestellten und kommerzialisierten Reagenzien unterliegen einem vollständigen Qualitätssystem, beginnend mit dem Eingang des Rohmaterials bis hin zur endgültigen Kommerzialisierung des Produktes. Jede Charge wird einer Qualitätskontrolle unterzogen und nur dann auf den Markt gebracht, wenn sie die Freigabekriterien erfüllt.



2023/10

BIO-RAD

INHALTSVERZEICHNIS

- 1 - ZWECKBESTIMMUNG
- 2 - VORTEILE DES PLATELIA RABIES II KITS
- 3 - PRINZIP DES PLATELIA RABIES II TESTS
- 4 - ZUSAMMENSETZUNG DES PLATELIA RABIES II KITS
- 5 - ZUBEREITUNG DER REAGENZIEN
- 6 - AUFBEWAHRUNG - HALTBARKEIT
- 7 - PROBEN
- 8 - TESTPROTOKOLL
- 9 - BERECHNUNG UND AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE
- 10 - GRENZEN DES TESTS
- 11 - AUSSTATTUNG UND MATERIALIEN, DIE NÖTIG SIND, ABER NICHT MITGELIEFERT WERDEN
- 12 - VORSICHTSMASSNAHMEN
- 13 - LITERATUR

1 - ZWECKBESTIMMUNG

Der PLATELIA RABIES II ist ein In-Vitro-Veterinärdiagnostischer Elisa Test zum Nachweis und zur Titrierung von IgG Anti-Tollwut Virus Glycoprotein in Serum von Tieren (Hunde, Katzen, Füchse).

2 - VORTEILE DES PLATELIA RABIES II KITS

Die Tollwut ist eine der ältesten Viruskrankheiten, die Menschen und Tiere befallen kann. Das Tollwut-Virus ist ein hochgradig neurotroper Virus, das bei Säugetieren zu einer im Allgemeinen tödlich verlaufenden Enzephalitis führt. Meist wird das Virus durch Bisse von tollwütigen Tieren über deren Speichel übertragen. Durch Impf- und Kontrollprogramme zum Schutz der Tierpopulationen konnte die Krankheit in mehreren westeuropäischen Ländern und in einigen Ländern Südamerikas ausgerottet werden.

Am 3. Juli 2004 trat eine neue europäische Verordnung in Kraft, die das internationale Reisen von Fleisch fressenden Haustieren aus Ländern mit Tollwutaufkommen in tollwutfreie Länder betrifft. Fleisch fressende Haustiere dürfen nur dann reisen, wenn ihr Serum mindestens 0.5 IU/ml (Internationale Einheiten/ml) an Tollwut neutralisierenden Antikörpern enthält.

Die Anti-Tollwut-Antikörper Titrierung hat mehrere praktische Anwendungen:

- Individuelle Serologie bei internationalen Handelswegen: Anti-Tollwut-Antikörper werden in spezialisierten Laboratorien nachgewiesen, um den Grad der Immunisierung von geimpften Tieren (Katzen und Hunde) zu bestimmen. Ein Antikörper-Gehalt gleich oder größer 0.5 IU/ml wird von den Experten des OIE als ausreichender Grad einer Serokonversion bewertet, oberhalb dessen eine Schutzimpfung als erfolgreich angesehen wird.
- Bestätigung des Impfstatus während einer Impfkampagne: Die Kontrolle der Anti-Tollwut-Antikörper ermöglicht indirekte Rückschlüsse auf die Wirksamkeit von Schluckimpfungskampagnen an Wildtieren (Füchse).

3 - PRINZIP DES PLATELIA RABIES II TESTS

PLATELIA RABIES II ist eine immun-enzymatische Technik zum Nachweis von Tollwut-Virus Anti-Glycoprotein Antikörpern. Dieser Test kann an Serum von bestimmten Tierarten – Hunde, Katzen und Füchse – durchgeführt werden.

Der Test beruht auf einer, als indirekter Elisa Test bekannten Fest-Phasen-Enzym Immuntest-Technik. Eine Mikrotiterplatte wird mit Tollwut-Glycoprotein beschichtet, das aus der inaktivierten und gereinigten Virusmembran gewonnenen wird. Das Enzym-Konjugat besteht aus einem, mit Peroxidase gekoppeltem Protein A aus *Staphylococcus aureus*. Mit, gegen die OIE-Standards kalibrierten Positivkontrollen kann der Anti-Tollwut-Antikörper Titer qualitativ und quantitativ in Serum bestimmt werden.

Bei der Durchführung des Tests laufen folgende Reaktionsschritte ab:

- 1 - In die mit Glycoprotein beschichteten Vertiefungen der Mikrotiterplatten werden sowohl die Seren als auch die kalibrierten Positivkontrollen oder die Quantifizierungsstandards verteilt. Während der einstündigen Inkubation bei 37°C binden die Anti-Tollwut-Antikörper der Probe an das Glycoprotein in den Vertiefungen der Mikrotiterplatten. Nach der Inkubation werden nicht gebundene Antikörper und andere Serum-Proteine, durch Waschen entfernt.

- 2 - Das Konjugat (Protein A markiert mit Peroxidase) wird in die Vertiefungen der Mikrotiterplatte gegeben. Während der zweiten einstündigen Inkubation bei 37°C binden das markierte Protein A an die Anti-Tollwut-Antikörper-Antigen Komplexe in den Vertiefungen der Mikrotiterplatte. Nicht gebundenes Konjugat wird durch Waschen entfernt.
- 3 - Die Anwesenheit des Immunkomplexes wird durch die Zugabe einer Lösung nachgewiesen, die ein Peroxidase-Substrat und ein Chromogen enthält, das eine Farbreaktion hervorruft.
- 4 - Nach 30-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wird die enzymatische Reaktion durch die Zugabe von 1 N H₂SO₄ Lösung gestoppt. Die Messung der optischen Dichte erfolgt mit einem Spektrophotometer bei 450 - 620 nm. Die optische Dichte ist proportional zur Menge der Anti-Tollwut-Antikörper in den Proben. Aus den Quantifizierungsstandards (S1 bis S6), die durch serielle Verdünnungen der R4b kalibrierten Positivkontrollen hergestellt werden, wird eine Standardkurve erstellt.

Die Werte der optischen Dichte der unbekannten Proben werden mit denen der Positivkontrollen verglichen. Serentiter in Quantifizierungstests erhält man durch direktes Ablesen an der Standardkurve. Sie werden in Equivalenten Einheiten pro ml (EU/ml) angegeben, die den durch Seroneutralisation definierten Internationalen Einheiten entsprechen.

4 - ZUSAMMENSETZUNG DES PLATELIA RABIES II KITS

Alle Reagenzien dürfen nur zur *In-Vitro*-Veterinärdiagnostik verwendet werden.

Das Kit enthält ausreichend Reagenzien für 2 x 96 Tests. Bei Durchführung von qualitativen Tests können pro Mikrotiterplatte 90 Proben analysiert werden. Bei quantitativen Tests können an bis zu 80 Proben genaue Quantifizierungen der Tollwut-Antikörper durchgeführt werden, wenn ein Quantifizierungssystem benutzt wird.

BEZEICHNUNG	ART VON REAGENZIEN	MENGE
R1	Mikrotiterplatte: 12 Streifen mit je 8 Vertiefungen, die mit dem Tollwut Virus Glycoprotein beschichtet sind	2 Platten
R2	Waschlösung: 10-fach konzentrierter Tris-NaCl Puffer Konservierungsmittel: ProClin™ 300 (0,01%)	1 Flasche (250 ml)
R3	Negativkontrolle: Nicht reaktive Kontrolle synthetischen Ursprungs; TRIS-EDTA Konservierungsmittel: ProClin™ 300 (0,1%)	1 Fläschchen (0,6 ml)
R4a	0,5 EU/ml Positivkontrolle: 0.5 EU/ml kalibrierte Positivkontrolle Glycin-Puffer mit BSA und Hunde Serum mit Anti-Tollwut- IgG. Farbe Gelb. Konservierungsmittel: ProClin™ 300 (0,1%)	1 Fläschchen (0,6 ml)
R4b	4 EU/ml Positivkontrolle: 4 EU/ml kalibrierte Positivkontrolle Glycin-Puffer mit BSA und Hunde Serum mit Anti-Tollwut- IgG. Farbe Blau. Konservierungsmittel: ProClin™ 300 (0,1%)	1 Fläschchen (0,6 ml)
R6	Probenverdünnungsmittel: Gebrauchsfertiger TRIS - EDTA Puffer zur Probenverdünnung. Farbe Rot. Konservierungsmittel: ProClin™ 300 (0,1%)	2 Flaschen (2 x 125 ml)
R7	Konjugat: Lösung mit Protein A-Peroxidase und gereinigtem Rinderprotein. 10-fach konzentriert. Farbe Grün. Konservierungsmittel: ProClin™ 300 (0,1%)	1 Flasche (3 ml)
R8	Peroxidase Substratpuffer: Lösung aus Zitronensäure und Natriumazetat mit 0,015% H ₂ O ₂ und 4% Dimethylsulfoxid (DMSO)	1 Fläschchen (60 ml)
R9	Chromogen: Tetramethylbenzidine (TMB) Lösung 0.25%	1 Fläschchen (5 ml)
R10	Stopplösung: 1 N Schwefelsäure-Lösung	1 Fläschchen (28 ml)
	Selbsthaftende Folie für Mikrotiterplatten	6

5 - ZUBEREITUNG DER REAGENZIEN

Note:

Die Reagenzien vor der Verwendung über einen Zeitraum von 30 Minuten auf Raumtemperatur (+18°C / + 30°C) erwärmen lassen. Die Reagenzien vor dem Öffnen durch vorsichtiges Mischen homogenisieren.

1 - Gebrauchsfertige Reagenzien

• Mikrotiterplatten (R1)

• Vor der Verwendung die Mikrotiterplatten in ihrer Schutzverpackung auf Raumtemperatur (+18°C bis +30°C) erwärmen lassen, um eine Ansammlung von Kondenswasser in den Vertiefungen zu vermeiden. Alle nicht verwendeten Streifen sofort in die Schutzverpackung zurücklegen; den Beutel nach Entfernen von Luft dicht verschließen und bei +2°C und +8°C aufbewahren.

• Probenverdünnungsmittel (R6)

• Stopplösung (R10)

2 - Herzustellende Reagenzien

• Waschlösung (R2)

Die Waschlösung R2 im Verhältnis 1/10 mit destilliertem Wasser verdünnen (zum Beispiel 100 ml Reagenz R2 in 900 ml destilliertem Wasser). Pro Platte werden 500 ml benötigt.

• Negativkontrolle (R3)

Die Negativkontrolle im Verhältnis 1/100 in R6 verdünnen.

• 0.5 EU/ml Positivkontrolle (R4a)

Die R4a Positivkontrolle in Verhältnis 1/100 in R6 verdünnen

• 4 EU/ml Positivkontrolle (R4b)

Die R4b Positivkontrolle in Verhältnis 1/100 in R6 verdünnen

• Konjugat (R7)

Die Lösung ist 10-fach konzentriert. Zur Herstellung von verdünnter Konjugatlösung 1 Volumen konzentriertes Konjugat zu 9 Volumen zubereiteter 1X Waschlösung (R2) geben. Für eine komplette Mikrotiterplatte werden 11 ml benötigt.

• Enzymatische Entwicklungslösung (R8 + R9)

Reagenz R9 im Verhältnis 1/11 in Reagenz R8 verdünnen (zum Beispiel: 0.1 ml Reagenz R9 in 1 ml Reagenz R8). 11 ml enzymatische Entwicklungslösung sind ausreichend für 1 Mikrotiterplatte. Vorsichtig mischen und keinen Vortex® Mixer benutzen.

3 - Herstellung der Quantifizierungsstandards für einen quantitativen Test

Für jeden quantitativen Tests mit dem PLATELIA RABIES II die 6 Quantifizierungsstandards S1 bis S6 einsetzen.

Die R4b Positivkontrolle (4 EU/ml) entspricht dem Quantifizierungsstandard S6.

Die Quantifizierungsstandards S5 bis S1 werden durch serielle Verdünnung des Reagenz R4b erstellt. Die Verdünnungen werden unter Verwendung von Probenverdünnungsmittel (Reagenz R6) hergestellt.

Quantifizierungs-standards		Durch serielle Verdünnung der Positivkontrolle R4b erhaltene Konzentrationen
S6	R4b verdünnt 1/100	4 EU/ml
S5	S6 verdünnt 1/2	2 EU/ml
S4	S5 verdünnt 1/2	1 EU/ml
S3	S4 verdünnt 1/2	0,5 EU/ml
S2	S3 verdünnt 1/2	0,25 EU/ml
S1	S2 verdünnt 1/2	0,125 EU/ml

6 - AUFBEWAHRUNG - HALTBARKEIT

Alle mitgelieferte Komponenten des PLATELIA RABIES II Kits müssen bei Temperaturen zwischen +2°C und +8°C gelagert und können bis Ablauf des auf dem Kit angegebenen Haltbarkeitsdatums verwendet werden. Reagenz R2 (10 x) kann vor der Herstellung bei Temperaturen zwischen +2°C und +25°C gelagert werden.

Nachfolgend ist die Haltbarkeit der Reagenzien nach Herstellung aufgeführt:

	REAGENZIEN	BEMERKUNGEN	HALTBARKEIT
R1	Mikrotiterplatte	Nach dem Öffnen des verschweißten, mit Folie ausgekleideten Beutels müssen die nicht benötigten Streifen sofort wieder in den Beutel zurückgegeben und der Beutel wieder verschlossen werden. Das Trockenmittel muss im Folienbeutel verbleiben.	1 Monat bei +2°C bis +8°C
R2	Verdünnte Waschlösung		2 Wochen bei +2°C bis +8°C
R7	Verdünnte Konjugatlösung	Die verdünnte Konjugatlösung sollte vorzugsweise sofort verwendet werden.	8 Stunden bei +2°C bis +8°C
R8 + R9	Hergestellte Entwicklungslösung		6 Stunden bei Raumtemperatur (+18°C bis +30°C), muss stets vor Licht geschützt werden

7 - PROBEN

- Der PLATELIA RABIES II Test wurde zur Anwendung an tierischem (Hunde, Katzen und Füchse) Serum entwickelt.
- Der Test wird an Seren durchgeführt, welche im Verhältnis 1/100 in Reagenz R6 verdünnt wurden.
- Die Proben können bei +2°C bis +8°C gelagert werden, wenn der Nachweis innerhalb von 24 Stunden erfolgt. Sie können bei -20°C 6 Monate lang gelagert werden. Die Proben können 3 Mal tiefgefroren und wieder aufgetaut werden. Eingefrorene Proben müssen nach dem Auftauen vor der Durchführung des Tests gut durchmischt werden.

Anmerkung: Gegebenenfalls schwebende Fibrinpartikel oder -aggregate, welche zu falsch-positiven Befunden führen können durch Zentrifugation entfernen.

8 - TESTPROTOKOLL

Das angegebene Protokoll genau befolgen.

Die Negativ- und Positivkontrollen für jeden Testlauf auf allen Mikrotiterplatten verwenden, um die Qualität des Nachweises im qualitativen Test zu validieren. Wird eine Quantifizierung durchgeführt, müssen auf jeder Platte die Negativkontrollen und die Quantifizierungsstandards aufgebracht werden. In beiden Fällen der empfohlenen Plattenbelegung für Mikrotiterplatten folgen.

Die GLP-Richtlinien einhalten.

1. Den Plattenhalter und die erforderliche Anzahl an Streifen (R1) aus dem Schutzbeutel entnehmen. Die nicht benötigten Streifen zusammen mit dem Trockenmittel-Beutel in den Mikrotiterplattenbeutel legen und diesen hermetisch schließen.
2. Die Verteilung der Proben und den Identifizierungsplan wie folgt sorgfältig durchführen:

Belegungsplan der Mikrotiterplatten für qualitative Tests:												
	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...										

Belegungsplan der Mikrotiterplatten für quantitative Tests:												
	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. Für die qualitative Untersuchung, die Kontrollen R3, R4a und R4b sowie die unbekannten Seren im Verhältnis 1/100 in Reagenz R6 verdünnen (zum Beispiel: 10 µl der Probe in 990 µl Verdünnungslösung).

4. Für die quantitative Untersuchung die Quantifizierungsstandards vorbereiten (siehe auch Abschnitt 5.3) und die Kontrollen R3, R4a sowie die unbekannten Seren 1/100 in Reagenz R6 verdünnen (z. B.: 10 µl Probe in 990 µl Verdünnungslösung).
5. Je 100 µl der verdünnten Proben, Kontrollen und Quantifizierungsstandards entsprechend dem vorbereiteten Belegungsplan in die jeweiligen Vertiefungen der Mikrotiterplatte geben.
6. Die Mikrotiterplatte mit Klebefolie abdecken (das Blatt gegebenenfalls zuschneiden). Fest um die Platte herum andrücken, damit diese gut abschließt.
7. Die Streifen 60 Minuten $\pm$ 5 Minuten bei $37 \pm 2^\circ\text{C}$ inkubieren.
8. Die Waschlösung (R2) vorbereiten (siehe Abschnitt 5).
9. Vor dem Ende der ersten Inkubation die Konjugatlösung (R7) vorbereiten (siehe Abschnitt 5).
10. Die Klebefolie entfernen und 3 Waschzyklen durchführen. Optimale Waschbedingungen werden mit den Bio-Rad Mikrotiterplatten-Waschgeräten PW40, PW41 oder 1575 mit Programm TSE 3 erzielt. Die Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschzyklus nicht länger als 5 Minuten stehen lassen. Vor dem nächsten Schritt durch Umdrehen auf saugfähigem Papier trocknen.
11. In jede Vertiefung 100 µl Konjugatlösung (R7) geben. Mit einer neuen Klebefolie abdecken und 60 $\pm$ 5 Minuten bei $+37^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$ inkubieren.
12. Die enzymatische Entwicklungslösung (R8+R9) unmittelbar vor dem Gebrauch wie in Abschnitt 5 beschrieben vorbereiten.
13. Die Klebefolie entfernen und 5 Waschzyklen durchführen. Optimale Waschbedingungen werden mit den Bio-Rad Mikrotiterplatten-Waschgeräten PW40, PW41 oder 1575 mit Programm TSE 5 erzielt. Die Mikrotiterplatte nach dem letzten Waschzyklus nicht länger als 5 Minuten stehen lassen. Vor dem nächsten Schritt durch Umdrehen auf saugfähigem Papier trocknen.
14. Die Platte vor direktem Licht schützen und zügig 100 µl enzymatische Entwicklungslösung (R8 + R9) in jede Vertiefung geben. Die Mikrotiterplatte im Dunklen 30 Minuten $\pm$ 5 Minuten bei Raumtemperatur ($+18$ bis $+30^\circ\text{C}$) inkubieren.
ANMERKUNG: Während dieser Inkubation keine Klebefolie verwenden.
15. Unter Berücksichtigung derselben Sequenz und desselben Verteilungsrhythmus wie für die Entwicklungslösung 100 µl Stopplösung (R10) in jede Vertiefung geben.
16. Den Boden der Platte gründlich abwischen und die optische Dichte bei 450 nm - 620 nm (Dualer Wellenlängenmodus) innerhalb von 30 Min. nach dem Stoppen der Reaktion bestimmen (die Streifen müssen vor der Messung ständig vor Licht geschützt bleiben).
17. Vor dem Aufzeichnen der Ergebnisse überprüfen, ob die Messung mit dem Verteilungs- und dem Identifizierungsplan für die Mikrotiterplatten und der Proben übereinstimmt.

WASCHPARAMETER DER MIKROTITERPLATTEN

NAME: TSE 3

EDIT Mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CROSS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	N° OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	N° 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	-	-	-

NAME: TSE 5

EDIT Mode function	PLATE	Manifold	STRIPS	Met. (Method)	MODE	CROSS SW ASP.	ASP. TIME	VOLUME	OVER FLOW	LIQUID	FLOW	BOT. WASH NUMBER	BOTTOM TIME	BOT. ASP. NUMBER	SHAKE TIME	N° OF CYCLES	SOAKING	MET. INTER	N° OF KITS	KIT INTER
Main parameter	Flat01 (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	-	-	-

NAME DER MIKROTITERPLATTE: 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 - BERECHNUNG UND AUSWERTUNG DER ERGEBNISSE

Die Ergebnisse werden nach der Messung der Mikrotiterplatte bei 450 - 620 nm in Optischen Dichten (ODs) angegeben.

1. Qualitative Bestimmung

Für die qualitative Bestimmung alle Kontrollen (R3, R4a und R4b) für jeden Testlauf mit einbeziehen.

a) Voraussetzungen für die Validität der Ergebnisse

Kriterien	Validität
$OD\ R3(i) < 0,05$	Der OD-Wert jeder einzelnen Negativkontrolle muss niedriger als 0,05 Extinktionseinheiten sein. Der Test muss wiederholt werden, wenn mindestens ein Wert der Negativkontrolle außerhalb dieses Grenzwertes liegt.
$0,300 \leq R4a(i) \leq 1,200$	Jeder einzelne OD-Wert der R4a Positivkontrolle muss zwischen 0,300 und 1,200 Extinktionseinheiten liegen. Der Test muss wiederholt werden, wenn mindestens ein R4a OD-Wert außerhalb dieses Grenzwertes liegt.
$1,500 \leq R4b(i) \leq 3,500$	Jeder einzelne OD-Werte der R4b Positivkontrolle muß zwischen 1,500 und 3,500 Extinktionseinheiten liegen. Allerdings kann höchstens ein einzelner Wert eliminiert werden, wenn seine optische Dichte unter 1,500 oder über 3,500 Extinktionseinheiten liegt. Der Test muss wiederholt werden, wenn die OD-Werte der beiden R4b Positivkontrollen außerhalb dieses Grenzwertes liegen.

b) Interpretation der Ergebnisse

Der Grenzwert ist gleich dem Mittelwert der beiden R4a Positivkontrollen ($\overline{OD\ R4a}$) und entspricht dem Grenzwert der Serokonversion bei 0,5 EU/ml.

Der Wert einer hohen Serokonversion ist gleich dem Mittelwert der beiden R4b Positivkontrollen ($\overline{OD\ R4b}$) oder einer einzelnen R4b Positivkontrolle, falls ein abweichender Wert eliminiert wurde.

Die optische Dichte jeder einzelnen Proben wird mit dem Wert der hohen Serokonversion und dem des Grenzwertes verglichen.

Status	Ergebnis	Interpretation
Serokonvertiert +++	$OD\ Probe > \overline{OD\ R4b}$	Gemäß des PLATELIA RABIES II Tests stammen Proben mit einem OD Wert größer als der Wert der hohen Serokonversion von Individuen, die nach einer Impfung hoch serokonvertiert sind.
Serokonvertiert	$\overline{OD\ R4a} \leq OD\ Probe \leq \overline{OD\ R4b}$	Gemäß des PLATELIA RABIES II Tests stammen Proben mit einem OD Wert größer oder gleich dem Grenzwert und kleiner oder gleich dem Wert der hohen Serokonversion von Individuen, die nach einer Impfung serokonvertiert sind.
Nicht serokonvertiert	$OD\ Probe < \overline{OD\ R4a}$	Gemäß des PLATELIA RABIES II Tests stammen Proben mit einem OD Wert kleiner als der Grenzwert von Individuen, die nach einer Impfung keine ausreichende Serokonversion besitzen.

2. Quantitative Bestimmung

Für die quantitative Bestimmung alle Standards und Kontrollen (S1 bis S6, R3 und R4a) für jeden Testlauf mit einbeziehen.

a) Voraussetzungen für die Validität der Ergebnisse

Kriterien	Validität
$OD\ R3(i) < 0,05$	Der OD-Wert jeder einzelnen Negativkontrolle muss unter 0,05 Extinktionseinheiten liegen. Der Test muss wiederholt werden, wenn mindestens ein OD-Wert außerhalb dieses Grenzwertes liegt.
$0,300 \leq OD\ R4a(i) \leq 1,200$	Der OD-Wert jeder einzelnen R4a Positivkontrolle muss zwischen 0,300 und 1,200 Extinktionseinheiten liegen. Der Test muss wiederholt werden, wenn mindestens ein R4a OD-Wert außerhalb dieses Grenzwertes liegt.
$\overline{S1} < \overline{S2} < \overline{S3} < \overline{S4} < \overline{S5} < \overline{S6}$	Der OD Mittelwert für S1 bis S6 wird wie folgt berechnet: $\overline{S1}$ = Mittelwert der beiden S1 OD-Werte (entspricht 0,125 EU/ml) $\overline{S2}$ = Mittelwert der beiden S2 OD-Werte (entspricht 0,25 EU/ml) etc... Die Werte der Standards müssen wie folgt ansteigen: $\overline{S1} < \overline{S2} < \overline{S3} < \overline{S4} < \overline{S5} < \overline{S6}$.
$0,7 \leq \overline{S3/R4a} \leq 1,3$	Das Verhältnis zwischen $\overline{S3}$ (Mittelwert S3 Standard) und R4a (Mittelwert R4a) muss zwischen 0,7 und 1,3 liegen.

b) Interpretation der Ergebnisse

Der Grenzwert ist gleich dem Mittelwert der beiden OD-Werte des S3 Quantifizierungsstandards (S3). Der S3 Quantifizierungsstandard entspricht dem Grenzwert der Serokonversion bei 0,5 EU/ml.

Die Menge an Anti-Tollwut-Antikörpern in einer Probe wird bestimmt durch den Vergleich der optischen Dichte der Probe mit denen einer Standardkurve.

Serentiter werden in Äquivalenten Einheiten pro ml (EU/ml) angegeben, die den, durch Seroneutralisation definierten Internationalen Einheiten entsprechen.

Erstellung der Standardkurve:

Zur manuellen Datenverdichtung Millimeterpapier verwenden und die Durchschnittswerte der OD-Werte der Quantifizierungsstandards (S1 bis S6) auf der vertikalen (y) Achse eintragen. Die entsprechenden Konzentrationen in EU/ml auf der horizontalen (x) Achse eintragen. Eine Serie von Liniensegmenten ziehen, die durch die 6 Punkte gehen.

Zur automatischen Datenverdichtung wird zum Erstellen der Standardkurve aus den OD-Werten der Standards eine sog. glättende „Punkt-zu-Punkt“ Funktion eingesetzt.

Für eine unbekannte Probe kann ein quantitatives Ergebnis für den Anti-Tollwut-Antikörper Titer bestimmt werden, wenn der OD-Wert der Probe zwischen den Mittelwerten der jeweiligen optischen Dichten von S1 (0,125 EU/ml) und S6 (4 EU/ml) liegt. In diesem Fall kann der Titer der unbekannten Probe mit Hilfe der Standardkurve bestimmt werden. Auf der Standardkurve denjenigen Wert bestimmen, der dem OD-Wert der Probe auf der Y-Achse entspricht und eine horizontale Linie zur Standardkurve ziehen. Am Schnittpunkt mit der Standardkurve eine vertikale Linie zur X-Achse ziehen und die entsprechende Konzentration in EU/ml ablesen.

Ist der OD-Wert der unbekannten Probe höher als der Mittelwert der optischen Dichten des Standards S6, kann keine genaue Quantifizierung durchgeführt werden. Sollte eine genaue Quantifizierung nötig sein, muss die Probe im Verhältnis 1/10 oder mehr verdünnt und der Test wiederholt werden, um eine optische Dichte im Intervall der Standardkurve zu erhalten.

Anmerkung: Ein Auswertehilfsmittel sowie ein Umrechnungsprogramm für OD Werte in Titer ist auf Anfrage erhältlich (Rabies QT-ELISA BIO-RAD Vers. 200712.A.XLS) für Anwender verfügbar, die nicht mit Bio-Rad Elisa Readern ausgestattet sind.

Allgemeines Verständnis der Ergebnisse:

Ergebnisse Optische Dichte für die unbekannte Probe	Titer der unbekannten Probe (X)	Interpretation des Ergebnisses
$OD\ Probe > \overline{S6}$	$X > 4\ EU/ml$	Hoher Grad an Serokonversion. Sollte ein genauer Titer vonnöten sein, muss die Probe vor der Wiederholung des Tests verdünnt werden.
$\overline{S3} \leq OD\ Probe \leq \overline{S6}$	$X\ in\ EU/ml\ (0,5 - 4\ EU/ml)$	Ausreichender Grad an Serokonversion.
$\overline{S1} \leq OD\ Probe < \overline{S3}$	$X\ in\ EU/ml\ (0,125 - 0,5\ EU/ml)$	Gemäß des PLATELIA RABIES II Tests ungenügender Grad an Serokonversion.
$OD\ Probe < \overline{S1}$	-	Keine nachweisbare Serokonversion.

10 - GRENZEN DES TESTS

Eine unzureichende oder nicht nachweisbare Serokonversion wird, aufgrund einer verzögerten Immunantwort, eventuell von kürzlich geimpften Tieren berichtet. Gleichmaßen zu der offiziellen „Neutralisierender Antikörper Titrierungsmethode“ und in Übereinstimmung mit der Verordnung (EG) Nr. 998/2003, gültig ab 03. Juli 2004, sollte der PLATELIA RABIES II Test an Proben durchgeführt werden, die mindestens 30 Tage nach Impfung entnommen wurden.

11 - AUSSTATTUNG UND MATERIALIEN, DIE NÖTIG SIND, ABER NICHT MITGELIEFERT WERDEN

Ausstattung

- Mikrotiterplatten-Reader mit 450 und 620 nm Filtern (*)
- Mikrotiterplatten-Inkubator, eingestellt auf $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- Manuelle, halbautomatische oder automatische Mikrotiterplatten-Washer (*)
- Vortex® Mixer

(*) Bitte Kontaktieren Sie uns für weitere Informationen über die, von der technischen Abteilung von Bio-Rad empfohlenen Geräte.

Material

- automatische oder halbautomatische, einstellbare oder voreingestellte Pipetten und Mikropipetten mit denen Volumina von 10 bis 1000 µl und 1, 2 und 10 ml abgemessen und verteilt werden können.
- Meßzylinder mit Maßeinteilung für 25 ml, 50 ml, 100 ml und 1 000 ml.
- Einmal-Röhrchen.
- Destilliertes oder entionisiertes Wasser.
- Natriumhypochlorid (Bleichmittel).
- Saugfähiges Papier.
- Brille oder Sicherheitsbrille.
- Einmal-Handschuhe.
- Behälter für infektiösen Abfall.

12 - VORSICHTSMASSNAHMEN

1. Vorsichtsmaßnahmen

Die Qualität der Ergebnisse hängt von der korrekten Einhaltung folgender GLP-Richtlinien ab:

- Die Reagenzien müssen zwischen $+2^{\circ}\text{C}$ und $+8^{\circ}\text{C}$ gelagert werden.
- Keine Reagenzien verwenden, deren Haltbarkeitsdatum abgelaufen ist.
- Für den selben Testlauf keine Reagenzien aus unterschiedlichen Chargen mischen. Ausgenommen davon sind die generischen Reagenzien R2, R8, R9 und R10.
- Reagenzien vor Gebrauch über einen Zeitraum von 30 Min. auf Raumtemperatur erwärmen lassen.
- Reagenzien sorgfältig ansetzen und dabei jegliche Verunreinigung vermeiden.
- Den Test nicht in Gegenwart von reaktiven Dämpfen (Säure, Alkaline, Aldehyde) oder Staub, die die Enzymaktivität des Konjugats beeinträchtigen können, durchführen.
- Gründlich gewaschene und mit entionisiertem Wasser gespültes Glasmaterial oder vorzugsweise Einwegmaterialien verwenden.
- Die Mikrotiterplatte zwischen dem Ende eines Waschvorgangs und der Verteilung der nächsten Reagenzien nicht länger als 5 Minuten stehen lassen.
- Die Genauigkeit der Pipetten und die korrekte Funktionsweise der verwendeten Geräte überprüfen.

- Zur Verteilung des Konjugats und der Entwicklungslösung nie denselben Behälter verwenden.
- Die Enzymreaktion ist gegen Metall oder Metall-Ionen sehr empfindlich. Aus diesem Grund dürfen die verschiedenen Konjugat- und Substratlösungen nicht in Kontakt mit Metallteilen gebracht werden.
- Die Entwicklungslösung (Substratpuffer + Chromogen) muss farblos sein. Nimmt die Entwicklungslösung einige Minuten nach der Zubereitung eine blaue Färbung an, so darf das Reagenz nicht verwendet und muss ersetzt werden. Diese Lösung kann in einem sauberen Einmalplastikbehälter oder einem Glasbehälter zubereitet werden, der zuvor mit 1N HCl ausgewaschen, gut mit destilliertem Wasser gespült und getrocknet wurde. Die Lösung unbedingt im Dunklen aufbewahren.
- Für jede Probe eine neue Pipettenspitze verwenden.
- Das Testverfahren nicht verändern.
- Das Waschen der Mikrotiterplatte ist ein wichtiger Bestandteil des Verfahrens: die empfohlene Anzahl von Waschzyklen einhalten und sicherstellen, dass alle Vertiefungen zunächst vollständig gefüllt und anschließend vollständig geleert wurden. Unzureichendes Waschen kann zu unkorrekten Ergebnissen führen.

2. Gesundheits- und Sicherheitsanweisungen

Im Allgemeinen müssen die Hygienebedingungen, die Maßnahmen zur biologischen Sicherheit und die GLP-Richtlinien den jeweils geltenden Richtlinien der nationalen Behörden entsprechen.

Alle Reagenzien des Kits sind zum Gebrauch für die *“In-vitro-Veterinärdiagnostik“* bestimmt - Serum von Hunden, Katzen und Füchsen.

- Bei der Handhabung mit Reagenzien und Proben Einweghandschuhe tragen. Nach der Handhabung mit Reagenzien und Proben gründlich die Hände waschen.
- Nicht mit dem Mund pipettieren.
- Alle Gegenstände, die in direktem Kontakt mit den Proben und den Reagenzien stehen sowie die Waschlösungen gelten als infektiöses Material.
- Das Verschütten von Proben oder Proben-haltigen Lösungen vermeiden.
- Verschüttete Flüssigkeiten müssen mit 10% Chlor-Bleiche entfernt werden. Wenn die kontaminierende Lösung säurehaltig ist, müssen die Flecken zuerst mit Natriumbikarbonat neutralisiert und anschließend mit Bleichmittel gereinigt und mit Saugpapier getrocknet werden. Das zur Reinigung benutzte Material muss nach der Dekontaminierung entsorgt werden.
- Die Proben und die kontaminierten Materialien und Produkte müssen nach der Dekontaminierung entsorgt werden, und zwar
 - entweder nach 30-minütigem Einweichen in Bleichmittel mit einer Endkonzentration von 5% Natriumhypochlorid.
 - oder nach mindestens 2-stündiger Behandlung im Autoklav bei 121°C.

Achtung: Lösungen, die Natriumhypochlorid enthalten, nie im Autoklav behandeln.

- Chemikalien müssen entsprechend der GLP-Richtlinien behandelt und entsorgt werden.
- Bezüglich Empfehlungen zu Risiken und Vorsichtsmaßnahmen in Zusammenhang mit einigen Chemikalien in diesem Testkit sind das/die Piktogramm(e) auf den Etiketten und die Angaben am Ende der Gebrauchsanweisung zu beachten. Das Sicherheitsdatenblatt ist auf www.bio-rad.com erhältlich.

13 - LITERATUR

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 J.L., BLANCHARD I., BOURHY H. 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 g-globulin. *J. Immunol.* 97, 822-827.
17. GRASSI M., WANDELER A.I., 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-PAVLINIC M., HOSTNIK P., LEVICNIK-STEZINAR S., ZALETEL-KRAGELJ 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 K.J., 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.

(BG)	• Този продукт съдържа човешки или животински компоненти. Бъдете внимателни при работа с него.
(CN)	• 本产品包含人/动物成分, 请小心处理。
(CN) Traditional	• 本產品包含人/動物成分, 請小心處理。
(CZ)	• Tento výrobek obsahuje lidské nebo zvířecí komponenty. Zacházejte s ním opatrně.
(DE)	• Dieses Produkt enthält Bestandteile menschlichen oder tierischen Ursprungs. Vorsichtig handhaben.
(DK)	• Dette produkt indeholder humane og animalske komponenter. Skal behandles med forsigtighed.
(EE)	• Käesolev toode sisaldab inim-või loomseid komponente. Käsitleda ettevaatlikult.
(EN)	• This product contains human or animal components. Handle with care.
(ES)	• Este producto contiene componentes humanos o animales. Manejar con cuidado.
(FI)	• Tässä tuotteessa on ihmistä tai eläimistä peräisin olevia osia. Käsittele varovasti.
(FR)	• Ce produit contient des composants d'origine humaine ou animale. Manipuler avec précaution.
(GR)	• Αυτό το προϊόν περιέχει ανθρώπινα ή ζωικά στοιχεία. Χειριστείτε το με προσοχή.
(HR)	• Ovaj proizvod sadrži ljudske ili životinjske sastojke. Pažljivo rukovati.
(HU)	• A készítmény emberi vagy állati eredetű összetevőket tartalmaz. Óvatosan kezelendő.
(IT)	• Questo prodotto contiene componenti umane o animali. Maneggiare con cura.
(JP)	• 本製品にはヒトまたは動物由来の構成成分が含まれます。取り扱いにご注意下さい。
(KR)	• 본 제품은 사람 또는 동물유래의 성분이 포함되어 있습니다. 취급에 주의하시기 바랍니다.
(LT)	• Šiame produktė yra žmogėškiosios arba gyvūninės kilmės sudėtinė dalia. Elgtis atsargiai.
(MT)	• Dan il-prodott fiħ komponenti umani jew tal-annimali. Uża b'attenzjoni.
(NL)	• Dit product bevat menselijke of dierlijke bestanddelen. Breekbaar.
(NO)	• Dette produktet inneholder humane eller animalske komponenter. Håndteres med forsiktighet.
(PL)	• Niniejszy produkt zawiera składniki pochodzenia ludzkiego lub zwierzęcego. Należy obchodzić się z nim ostrożnie.
(PT)	• Este medicamento contém componentes de origem humana ou animal. Manuseie com cuidado.
(RO)	• Acest produs conține materiale de origine umană sau animală. Manevrati-l cu grijă.
(SE)	• Denna produkt innehåller beståndsdelar från människa eller djur. Hantera produkten varsamt.
(SI)	• Izdelek vsebuje človeške ali živalske sestavine. Rokujte previdno.
(SK)	• Tento výrobok obsahuje ľudské alebo zvieracie zložky. Narábajte s ním opatrne.



H314 - H317 - H412
P280 - P305+P351+P338
P301+P330+P331
P302+P352 - P333+P313
P273 - P501

(BG)

опасно

Причинява тежки изгаряния на кожата и сериозно увреждане на очите. Може да причини алергична кожна реакция. Вреден за водните организми, с дълготраен ефект.

Използвайте предпазни ръкавици/предпазно облекло/ предпазни очила/предпазна маска за лице. ПРИ КОНТАКТ С ОЧИТЕ: Промивайте внимателно с вода в продължение на няколко минути. Свалете контактните лещи, ако има такива и доколкото това е възможно. Продължавайте да промивате. ПРИ ПОГЛЪЩАНЕ: изплакнете устата. НЕ предизвиквайте повръщане. ПРИ КОНТАКТ С КОЖАТА: Измийте обилно със сапун и вода. При поява на кожно дразнене или обрив на кожата: Потърсете медицински съвет/помощ. Да се избягва изпускане в околната среда. Изхвърлете съдържанието/контейнера в съответствие с местните/ регионалните/националните/международните разпоредби.

(CN)

危險

引起严重的皮肤灼伤和眼睛损伤。可能引起皮肤过敏反应。对水生生物有害并且有长期持续影响。

戴防护手套/穿防护服/戴防护眼罩/戴防护面具。如进入眼睛：用水小心冲洗几分钟。如戴隐形眼镜并可方便地取出，取出隐形眼镜。继续冲洗。如误吞咽：漱口。不要诱导呕吐。如皮肤沾染：用大量肥皂和水清洗。如发生皮肤刺激或皮疹：求医/就诊。避免释放到环境中。按照本地/地区/国家/国际惯例处理内容物/容器。

(CN (Traditional))

危險

引起嚴重的皮膚灼傷和眼睛損傷。可能引起皮膚過敏性反應。對水生生物有害並且有長期持續影響。

戴防護手套/穿防護服/戴防護眼罩/戴防護面具。如進入眼睛：用水小心沖洗幾分鐘。如戴隱形眼鏡並可方便地取出，取出隱形眼鏡。繼續沖洗。如誤吞咽：漱口。不要誘導嘔吐。如皮膚沾染：用大量肥皂和水清洗。如發生皮膚刺激或皮疹：求醫/就診。避免釋放到環境中。按照本地/地區/國家/國際規例處理內容物/容器。

(CZ)

Nebezpečí

Způsobuje těžké poleptání kůže a poškození očí. Může vyvolat alergickou kožní reakci. Škodlivý pro vodní organismy, s dlouhodobými účinky.

Používejte ochranné rukavice/ochranný oděv/ochranné brýle/obličejový štít. PŘI ZASAŽENÍ OČÍ: Několik minut opatrně vyplachujte vodou. Vyjměte kontaktní čočky, jsou-li nasazené a pokud je lze vyjmout snadno. Pokračujte ve vyplachování. PŘI POŽITÍ: Vypláchněte ústa. NEVYVOLÁVEJTE zvracení. PŘI STYKU S KÚŽELÍ: Omyjte velkým množstvím vody a mýdla. Při podráždění kůže nebo vyrážce: Vyhledejte lékařskou pomoc/ošetení. Zabraňte uvolnění do životního prostředí. Obsah/nádobu likvidujte v souladu s místními/regionálními/národními/mezinárodními předpisy.

(DE)

Gefahr

Verursacht schwere Verätzungen der Haut und schwere Augenschäden. Kann allergische Hautreaktionen verursachen. Schädlich für Wasserorganismen, mit langfristiger Wirkung.

Schutzhandschuhe/Schutzkleidung/Augenschutz/ Gesichtsschutz tragen. BEI KONTAKT MIT DEN AUGEN: Einige Minuten lang behutsam mit Wasser spülen. Vorhandene Kontaktlinsen nach Möglichkeit entfernen. Weiter spülen. BEI VERSCHLUCKEN: Mund ausspülen. KEIN Erbrechen herbeiführen. BEI KONTAKT MIT DER HAUT: Mit viel Wasser und Seife waschen. Bei Hautreizung oder -ausschlag: Ärztlichen Rat einholen/ ärztliche Hilfe hinzuziehen. Freisetzung in die Umwelt vermeiden. Entsorgung des Inhalts / des Behälters gemäß den örtlichen / regionalen / nationalen/ internationalen Vorschriften.

(DK)

Fare

Forårsager svære forbrændinger af huden og øjenskader. Kan forårsage allergisk hudreaktion. Skadelig for vandlevende organismer, med langvarige virkninger.

Bær beskyttelseshandsker/beskyttelsestøj/øjenskyttelse/ ansigtsbeskyttelse VED KONTAKT MED ØJENENE: Skyl forsigtigt med vand i flere minutter. Fjern eventuelle kontaktlinser, hvis dette kan gøres let. Fortsæt skylning. I TILFÆLDE AF INDTAGELSE: Skyl munden. Fremkald IKKE opkastning. VED KONTAKT MED HUDEN: Vask med rigeligt sæbe og vand. Ved hudirritation eller udslæt: Søg lægehjælp. Undgå udledning til miljøet. Bortskaffelse af indholdet/holderen i henhold til de lokale/regionale/ nationale/internationale forskrifter.

(EE)

Ettevaatust

Põhjustab rasket nahasöövitust ja silmakahjustusi. Võib põhjustada allergilist nahareaktsiooni. Ohtlik veorganisimidele, pikaajaline toime.

Kanda kaitsekindaid/kaitserõivastust/kaitseprille/ kaitsemaski. SILMA SATTUMISE KORRAL: loputada mitme minuti jooksul ettevaatlikult veega. Eemaldada kontaktläätsed, kui neid kasutatakse ja kui neid on kerge eemaldada. Loputada veel kord. ALLANEELAMISE KORRAL: loputada suud. MITTE kutsuda esile oksendamist. NAHALE SATTUMISE KORRAL: pesta rohke vee ja seebiga. Nahaärrituse või _obe korral: pööruda arsti poole. Vältida sattumist keskkonda. Sisul/ konteineri käitletust vastavuses kohalike/regionaalsete/ rahvuslike/rahvusvaheliste nõuetega.

(EN)

Danger

Causes severe skin burns and eye damage. May cause an allergic skin reaction. Harmful to aquatic life with long lasting effects.

Wear protective gloves/protective clothing/eye protection/ face protection. IF IN EYES: Rinse cautiously with water for several minutes. Remove contact lenses, if present and easy to do. Continue rinsing. IF SWALLOWED: rinse mouth. Do NOT induce vomiting. IF ON SKIN: Wash with plenty of soap and water. If skin irritation or rash occurs: Get medical advice/attention. Avoid release to the environment. Dispose of contents/container in accordance with local/regional/national/international regulations.

(ES)

Peligro

Provoca quemaduras graves en la piel y lesiones oculares graves. Puede provocar una reacción alérgica en la piel. Nocivo para los organismos acuáticos, con efectos nocivos duraderos.

Llevar guantes que aislen del frío/gafas/máscara. EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando. EN CASO DE INGESTIÓN: Enjuagarse la boca. NO provocar el vómito. EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL: Lavar con agua y jabón abundantes. En caso de irritación o erupción cutánea: Consultar a un médico. Evitar su liberación al medio ambiente. Eliminar el contenido o el recipiente conforme a la reglamentación local/regional/nacional/internacional.

(FI)

Vaara

Voimakkaasti ihoa syövyttävää ja silmiä vaurioittavaa. Voi aiheuttaa allergisen ihoreaktion. Haitallista vesielioille, pitkäaikaisia haittavaikutuksia.

Käytä suojakäsineitä/suojavaatetusta/silmiensuojainta/kansansuojainta. JOS KEMIKAALIA JOUTUU SILMIIN: Huuhdo huolellisesti vedellä usean minuutin ajan. Poista piilolinssit, _edical voi tehdä helposti. Jatka huuhtomista. JOS KEMIKAALIA ON NIELTY: Huuhdo suu. EI saa oksennuttaa. JOS KEMIKAALIA JOUTUU IHOLLE: Pese runsaalla vedellä ja saippualla. Jos ilmenee ihoärsytystä tai ihottumaa: Hakeudu lääkäriin. Vältettävä päästämistä ympäristöön. Säilytä säiliö(t) noudattaen paikallisia/alueellisia/kansallisia/kansainvälisiä määräyksiä.

(FR)

Danger

Provoque des brûlures de la peau et des lésions oculaires graves. Peut provoquer une allergie cutanée. Nocif pour les organismes aquatiques, entraîne des effets néfastes à long terme.

Porter des gants de protection/des vêtements de protection/ un équipement de protection des yeux/du visage. EN CAS DE CONTACT AVEC LES YEUX: rincer avec précaution à l'eau pendant plusieurs minutes. Enlever les lentilles de contact si la victime en porte et si elles peuvent être facilement enlevées. Continuer à rincer. EN CAS D'INGESTION: rincer la bouche. NE PAS faire vomir. EN CAS DE CONTACT AVEC LA PEAU: laver abondamment à l'eau et au savon. En cas d'irritation ou d'éruption cutanée: consulter un médecin. Éviter le rejet dans l'environnement. Éliminer le contenu/récipient conformément à la réglementation locale/régionale/nationale/internationale.

(GR)

Κίνδυνος

Προκαλεί σοβαρά δερματικά εγκαύματα και οφθαλμικές βλάβες. Μπορεί να προκαλέσει αλλεργική δερματική αντίδραση. Επιβλαβές για τους υδρόβιους οργανισμούς, με μακροχρόνιες επιπτώσεις.

Na φορέα προστατευτικά γάντια/προστατευτικά ενδύματα/ μέσα ατομικής προστασίας για ταμάτια/πρόσωπο. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΑ ΜΑΤΙΑ: Ξεπλύνετε προσεκτικά με νερό για αρκετά λεπτά. Εάν υπάρχουν φακοί επαφής, αφαιρέστε τους, εφόσον είναι εύκολο. Συνεχίστε να ξεπλύνετε. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΚΑΤΑΠΟΣΗΣ: Ξεπλύνετε το στόμα. ΜΗΝ προκαλέσετε εμετό. ΣΕ ΠΕΡΙΠΤΩΣΗ ΕΠΑΦΗΣ ΜΕ ΤΟ ΔΕΡΜΑ: Πλύνετε με άφθονο νερό και σαπούνι. Εάν παρατηρηθεί ερεθισμός του δέρματος ή εμφανιστεί εξάνθημα: Συμβουλευθείτε/

Επισκεφθείτε γιατρό. Να αποφεύγεται η ελευθέρωση στο περιβάλλον. Απορρίψτε τα περιεχόμενα/δοχείο σύμφωνα με τους τοπικούς/εθνικούς/διεθνείς κανονισμούς.

(HR)

Opasnost

Uzrokuje teške opekline kože i ozljede oka. Može izazvati alergijsku reakciju na koži. Štetno za vodeni okoliš s dugotrajnim učincima.

Nositi zaštitne rukavice/zaštitnu odijelo/zaštitu za oči/zaštitu za lice. U SLUČAJU DODIRA S OČIMA: oprezno ispirati vodom nekoliko minuta. Ukloniti kontaktne leće ukoliko ih nosite i ako se one lako uklanjaju. Nastaviti ispiranje. AKO SE PROGUTA: ispirati usta. NE izazivati povraćanje. U SLUČAJU DODIRA S KOŽOM: oprati velikom količinom sapuna i vode. U slučaju nadražaja ili osipa na koži: zatvoriti savjet/pomoć liječnika. Izbjegavati puštanje u okoliš. Odložite sadržaje /spremnike u skladu s lokalnim/regionalnim/nacionalnim/međunarodnim odredbama.

(HU)

Veszély

Smarkiai nudegina odą ir pažeidžia akis. Alergiás bőrreakciót válthat ki. Ártalmas a vízi élővilágra, hosszán tartó károsodást okoz.

Védőkesztyű/védőruha/szemvédő/arcvédő használatát kötelező. SZEMBE KERÜLÉS esetén: Több percig tartó óvatos öblítés vízzel. Adott esetben a kontaktlencsék eltávolítása, ha könnyen megoldható. Az öblítés folytatása. LENYELÉS ESETÉN: a szájat ki kell öblíteni. TILOS hánytatni. HA BŐRRE KERÜL: Lemosás bő szappanos vízzel. Bőrirritáció vagy kiütések megjelenése esetén: orvosi ellátást kell kérni. Kerülni kell az anyagnak a környezetbe való kijutását. Az edény tartalmát / a tartályt a helyi/regionális/nemzeti/nemzetközi szabályozásoknak megfelelően kell hulladékként elhelyezni.

(IT)

Pericolo

Provoca gravi ustioni cutanee e gravi lesioni oculari. Può provocare una reazione allergica cutanea. Nocivo per gli organismi acquatici con effetti di lunga durata.

Indossare guanti/indumenti protettivi/Proteggere gli occhi/il viso. IN CASO DI CONTATTO CON GLI OCCHI: sciacquare accuratamente per parecchi minuti. Togliere le eventuali lenti a contatto se è agevole farlo. Continuare a sciacquare. IN CASO DI INGESTIONE: sciacquare la bocca. NON provocare il vomito. IN CASO DI CONTATTO CON LA PELLE: lavare abbondantemente con acqua e sapone. In caso di irritazione o eruzione della pelle: consultare un medico. Non disperdere nell'ambiente. Smaltire il prodotto/recipiente in conformità con le disposizioni locali / regionali / nazionali / internazionali.

(JP)

危険

重篤な皮膚の薬傷及び目の損傷。アレルギー性皮膚反応を起すおそれ、長期継続的影響によって水生生物に有害。保護手袋/保護衣/保護眼鏡/顔保護面の着用。・眼に入った場合：水で数分間注意深く洗うこと。次にコンタクトレンズを着用していて容易に外せる場合は外すこと。その後も洗浄を続けること。飲み込んだ場合：口をすすぐこと。無理に吐かせないこと。・皮膚に付着した場合：多量の水と石けん（鹸）で洗うこと。・皮膚刺激又は発疹（疹）が生じた場合：医師の診断 / 手当てを受けること。・環境への放出を避けること。・現地/地域/国/国際規定に従い内容物・容器の露出。

(KR)**위험**

피부에 심한 화상과 눈에 손상을 일으킴 알레르기성 피부 반응을 일으킬 수 있음. 장기적인 영향에 의해 수생생물에 유해함.

(보호장갑·보호의·보안경·안면보호구)를(을) 착용하십시오. 눈에 묻으면 몇 분간 물로 조심해서 씻으십시오. 가능하면 콘택트렌즈를 제거하십시오. 계속 씻으십시오. 삼켰다면: 입을 씻어내십시오. 토하게 하려 하지 마십시오. 피부에 묻으면 다량의 비누와 물로 씻으십시오. 피부자극성 또는 흥반이 나타나면 의학적인 조차·조언을 구하십시오. 환경으로 배출하지 마십시오. 현지/지역/국가/국제규정에 따라서 내용물/용기 노출.

(LT)**Pavojinga**

Smarkiai nudegina odą ir pažeidžia akis. Gali sukelti alerginę odos reakciją. Kenksminga vandens organizmams, sukelia ilgalaikius pakitimus.

Mūvėti apsaugines pirštines/dėvėti apsauginius drabužius/ naudoti akių (veido) apsaugos priemonės. PATEKUS Į AKIS: Kelias minutes atsargiai plauti vandeniu. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis. PRARIJUS: išskalauti burną. NESKATINTI vėmimo. PATEKUS ANT ODOS: Nuplauti dideliu kiekiu muilo ir vandens. Jeigu sudirginama oda arba ją išberia: kreiptis į gydytoją. Saugoti, kad nepatektų į aplinką. Turinį/talpą išpilti (išmesti) - šalinti pagal vietines / regionines / nacionalines / tarptautines taisykles.

(LV)**Briesmas**

Smarkiai nudegina odā ir pažeidžia akis. Gali sukelti alerginē odos reakcijā. Kenksminga vandens organismams, sukelia ilgalaikius pakitumus.

Mūvēti apsaugines pirštines/dēvēti apsauginius drabužius/ naudoti akių (veido) apsaugos priemones. PATEKUS Į AKIS: Kelias minutes atsargiai plauti vandeniu. Išimti kontaktinius lęšius, jeigu jie yra ir jeigu lengvai galima tai padaryti. Toliau plauti akis. PRARIJUS: išskalauti burną. NESKATINTI vėmimo. PATEKUS ANT ODOS: Nuplauti dideliu kiekiu muilo ir vandens. Jeigu sudirginama oda arba ją išberia: kreiptis į gydytoją. Saugoti, kad nepatektų į aplinką. Turinį/talpą išpilti (išmesti) - šalinti pagal vietines / regionines / nacionalines / tarptautines taisykles.

(NL)**Gevaar**

Veroorzaakt ernstige brandwonden en oogletsel. Kan een allergische huidreactie veroorzaken. Schadelijk voor in het water levende organismen, met langdurige gevolgen.

Beschermende handschoenen/beschermende kleding/oogbescherming/gelaatsbescherming dragen. BIJ CONTACT MET DE OGEN: voorzichtig afspoelen met water gedurende een aantal minuten; contactlenzen verwijderen, indien mogelijk; blijven spoelen. NA INSLIKKEN: de mond spoelen - GEEN braken opwekken. BIJ CONTACT MET DE HUID: met veel water en zeep wassen. Bij huidirritatie of uitslag: een arts raadplegen. Voorkom lozing in het milieu. De inhoud en de verpakking verwerken volgens de plaatselijke/regionale/ nationale/internationale voorschriften.

(NO)**Fare**

Forårsaker alvorlige hudforbrenninger og øyeskader. Kan forårsake allergiske hudreaksjoner. Skadelig for vannlevende organismer, langtidsvirkning.

Bruk vernehansker/verneklær/vernebriller/ansiktsskjerm. VED KONTAKT MED ØYNENE: Skyll forsiktig med vann i opptil flere minutter. Fjern evt. kontaktlinser såfremt dette er lett mulig. Fortsett skylingen. VED SVELGING: Skyll munnen. IKKE fremkall brekninger. VED HUDKONTAKT: Vask med store mengder vann og såpe. Ved hudirritasjon eller -utslett: Kontakt / tilkall lege. Unngå utslipp til miljøet. Innholdet / emballasjen skal avhendes i henhold til de lokale / regionale / nasjonale / internasjonale forskrifter.

(PL)**Niebezpieczeństwo**

Powoduje poważne oparzenia skóry oraz uszkodzenia oczu. Może powodować reakcję alergiczną skóry. Działa szkodliwie na organizmy wodne, powodując długotrwałe skutki.

Stosować rękawice ochronne/odzież ochronną/ochronę oczu/ochronę twarzy. W PRZYPADKU DOSTANIA SIĘ DO OCZU: Ostrożnie płukać wodą przez kilka minut. Wyjąć soczewki kontaktowe, jeżeli są i można je łatwo usunąć. Nadal płukać. W PRZYPADKU POŁKNIECIA: wypłukać usta. NIE wywoływać wymiotów. W PRZYPADKU KONTAKTU ZE SKÓRĄ: Umyć dużą ilością wody z mydłem. W przypadku wystąpienia podrażnienia skóry lub wysypki: Zasięgnąć porady/zgłosić się pod opiekę lekarza. Unikać uwolnienia do środowiska. Zawartość / pojemnik usuwać zgodnie z przepisami miejscowymi / regionalnymi / narodowymi / międzynarodowymi.

(PT)**Perigo**

Provoca queimaduras na pele e lesões oculares graves. Pode provocar uma reacção alérgica cutânea. Nocivo para os organismos aquáticos com efeitos duradouros.

Usar luvas de protecção/vestuário de protecção/protecção ocular/protecção facial. SE ENTRAR EM CONTACTO COM OS OLHOS: enxaguar cuidadosamente com água durante vários minutos. Se usar lentes de contacto, retire-as, se tal lhe for possível. Continuar a enxaguar. EM CASO DE INGESTÃO: enxaguar a boca. NÃO provocar o vômito. SE ENTRAR EM CONTACTO COM A PELE: lavar com sabonete e água abundantes. Em caso de irritação ou erupção cutânea: consulte um médico. Evitar a libertação para o ambiente. Eliminar o conteúdo/recipiente de acordo com a legislação local/regional/nacional/internacional.

(RO)**Pericol**

Provoacă arsuri grave ale pielii și lezarea ochilor. Poate provoca o reacție alergică a pielii. Nociv pentru mediul acvatic cu efecte pe termen lung.

Purtati mănuși de protecție/imbrăcămintă de protecție/ echipament de protecție a ochilor/ chipament de protecție a feței. ÎN CAZ DE CONTACT CU OCHII: clătiți cu atenție cu apă timp de mai multe minute. Scoateți lentilele de contact, dacă este cazul și dacă acest lucru se poate face cu ușurință. Continuați să clătiți. ÎN CAZ DE ÎNGHIȚIRE: clătiți gura. NU provocați vomă. ÎN CAZ DE CONTACT CU PIELEA: spălați cu multă apă și săpun. În caz de iritare a pielii sau de erupție cutanată: consultați medicul. Evitați dispersarea în mediu. Aruncați conținutul/containerul în acord cu regulamentele locale/regionale/naționale/ internaționale.

(SE)**Fara**

Orsakar allvarliga frätskador på hud och ögon. Kan orsaka allergisk hudreaktion. Skadliga långtidseffekter för vattenlevande organismer.

Använd skyddshandskar/skyddskläder/ögonskydd/ansiktsskydd. VID KONTAKT MED ÖGONEN: Skölj försiktigt med vatten i flera minuter. Ta ur eventuella kontaktlinser om det går lätt. Fortsätt att skölja. VID FÖRTÄRING: Skölj munnen. Framkalla INTE kräkning. VID HUDKONTAKT: Tvätta med mycket tvål och vatten. Vid hudirritation eller utslag: Sök läkarhjälp. Undvik utsläpp till miljön. Innehållet / behållaren avfallshanteras enligt lokala / regionala / nationella / internationella föreskrifter.

(SL)**Nevarno**

Povzroča hude opekline kože in poškodbe oči. Lahko povzroči alergijski odziv kože. Škodljivo za vodne organizme, z dolgotrajnimi učinki.

Nositi zaščitne rokavice/zaščitno obleko/zaščito za oči/zaščito za obraz. PRI STIKU Z OČMI: previdno izpirajte z vodo nekaj minut. Odstranite kontaktne leče, če jih imate in če to lahko storite brez težav. Nadaljujte z izpiranjem. PRI ZAUŽITJU: izprati usta. NE izzvati bruhanja. PRI STIKU S KOŽO: umiti z veliko mila in vode. Če nastopi draženje kože ali se pojavi izpuščaj: poiščite zdravniško pomoč/oskrbo. Preprečiti sproščanje v okolje. Vsebino/vsebnik odstranite v skladu z lokalnimi/regionalnimi/narodnimi/mednarodnimi predpisi.

(SK)**Nebezpečenstvo**

Spôsobuje vážne poleptanie kože a poškodenie očí. Môže vyvolať alergickú kožnú reakciu. Škodlivý pre vodné organizmy, s dlhodobými účinkami.

Noste ochranné rukavice/ochranný odev/ochranné okuliare/ochranu tváre. PO ZASIAHNUTÍ OČÍ: Niekoľko minút ich opatrne vyplachujte vodou. Ak používate kontaktné šošovky a ak je to možné, odstráňte ich. Pokračujte vo vyplachovaní. PO POŽITÍ: vypláchnite ústa. Nevývolávajte zvracanie. PRI KONTAKTE S POKOŽKOU: Umyte veľkým množstvom vody a mydla. Ak sa prejaví podráždenie pokožky alebo sa vytvorí vyrážky: vyhľadajte lekársku pomoc/starostlivosť. Zabráňte uvoľneniu do životného prostredia. Zneškodnenie obsahu/obalu v súlade s miestnymi/oblastnými/národnými/medzinárodnými nariadeniami.

Bio-Rad

3, boulevard Raymond Poincaré
92430 Marnes-la-Coquette - France

Tel.: +33 (0)1 47 95 60 00

Fax: +33 (0)1 47 41 91 33

www.bio-rad.com

