

PLATELIA™ RABIES II KIT

Ad Usum Veterinarium

192 teste

REF: 3550180

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

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

2015/06

CUPRINS

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

1 - DOMENIUL DE UTILIZARE AL TRUSEI

Trusa PLATELIA™ RABIES II este un test de diagnostic *in vitro* de tip ELISA care permite detectia si titrarea IgG anti-glicoproteina virusului rabic in serul de animale (caini, pisici si vulpi).

2 - INTERESUL ASUPRA TRUSEI PLATELIA™ RABIES II

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

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

Titrarea anticorpilor anti-rabie are cateva aplicatii practice:

- ♦ Serologia individuala in vederea comertului international: anticorpii anti-rabie se masoara in laboratoare specializate pentru a determina gradul de imunitate al animalelor vaccinate (pisici si caini). Un nivel al anticorpilor egal sau superior valorii de 0.5 UI/ml este considerat de catre expertii OIE ca nivel acceptabil de seroconversie, de la care vaccinarea poate fi considerata ca fiind de succes.
- ♦ Confirmarea statusului de vaccinare in cursul unei campanii de vaccinare: controlul anticorpilor anti-rabie permite evaluarea indirecta a eficientei vaccinarii orale in cazul campaniei de vaccinare la animalele salbatice(vulpi).

3 – PRINCIPIUL TESTULUI PLATELIA™ RABIES II

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

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

Implementarea testului cuprinde urmatoarele etape de reactie:

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

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

4 – COMPOZITIA TRUSEI PLATELIA™ RABIES II

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

Trusa conține o cantitate de reactivi suficientă pentru 2 x 96 teste. Pe fiecare microplacă pot fi analizate 90 probe în cazul în care se realizează o determinare calitativă. Dacă se utilizează un sistem cantitativ, până la 80 probe pot fi cuantificate precis pentru anticorpi anti-rabici.

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

5 – PREPARAREA REACTIVILOR

Nota:

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

Omogenizati reactivii prin agitare usoara inainte de deschiderea flacoanelor.

1. Reactivi gata de utilizare

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

2. Reactivi care trebuie reconstituiti

- ♦ Solutie de spalare (R2)

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

- ♦ Martor negativ (R3)

Diluati solutia 1/100 in R6

- ♦ Martor pozitiv 0,5 EU/ml (R4a)

Diluati martorul pozitiv R4a 1/100 in R6

- ♦ Martor pozitiv 4 EU/ml (R4b)

Diluati martorul pozitiv R4b 1/100 in R6

- ♦ Conjugat (R7)

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

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

Diluati reactivul R9 1/11 in reactivul R8 (de exemplu: 0.1 ml reactiv R9 in 1 ml reactiv R8), tinand cont de faptul ca 11 ml solutie de revelare a reactiei enzimatice sunt suficiente pentru 1 microplaca. Omogenizati usor. Evitati utilizarea unui agitator tip Vortex.

3. Prepararea Standardelor de Cuantificare pentru un test cantitativ

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

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

Standardele de cuantificare S5 pana la S1 se prepara prin dilutii seriale ale reactivului R4b.

Dilutiile se efectueaza cu ajutorul diluantului pentru proba (reactiv R6).

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

6 – CONDITII DE STOCARE - VALABILITATE

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

Valabilitatea reactivilor dupa preparare este urmatoarea:

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

7 - PROBE

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

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

8 – PROTOCOLUL DE TESTARE

Se recomanda respectarea cu strictete a protocolului indicat.

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

Se recomanda respectarea bunelor practici de laborator.

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

Configuratia microplacii pentru testul calitativ

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

Configuratia microplacii pentru testul cantitativ:

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

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

Parametrii spalatorului de microplaci

NUME: TSE 3

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

NUME: TSE 5

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

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

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

9 – CALCULAREA SI INTERPRETAREA REZULTATELOR

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

1. Determinare calitativa

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

a) Conditii de validare

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

b) Interpretarea rezultatelor

Valoarea Prag este egala cu media celor doi Martori Pozitivi R4a ($\overline{S3}$) si corespunde valorii prag de seroconversie la valoarea de 0,5 EU/ml.

Valoarea de seroconversie Ridicata este egala cu media celor doi Martori Pozitivi R4b ($\overline{DO}$ R4b), sau a unui control pozitiv R4b daca o valoare aberanta a fost eliminata.

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

Status	Rezultat	Interpretare
Seroconversi +++	$DO\ proba > (\overline{DO}\ R4b)$	Probele cu valoarea DO mai mare decat Valoarea de Seroconversie Ridicata provin de la indivizi cu un nivel inalt de protectie fata de infectia cu virus rabic dupa vaccinare, conform testului PLATELIA™ RABIES II.
Seroconversi	$(\overline{DO}\ R4a) \leq DO\ proba \leq (\overline{DO}\ R4b)$	Probele cu valoarea DO mai mare sau egala cu Valoarea Prag si mai mica sau egala cu Valoarea de Seroconversie Ridicata provin de la indivizi protejati in urma vaccinarii, conform testului PLATELIA™ RABIES II.
Fara seroconversie	$DO\ proba < (\overline{DO}\ R4a)$	Probele cu valoarea DO mai mica decat Valoarea Prag provin de la indivizi care prezinta un nivel de anticorpi anti-rabici insuficienti pentru a confirma eficienta vaccinarii conform testului PLATELIA™ RABIES II.

2. Determinarea cantitativa

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

a) Conditii de validare

Criterii	Validare
$DO\ R3(i) < 0.05$	Absorbanta individuala a fiecarui martor negativ trebuie sa fie mai mica decat 0.05. Testul trebuie repetat daca cel putin una dintre valori se situeaza in afara acestei limite.

$0.300 \leq DO \text{ R4a(i)} \leq 1.200$	Fiecare valoare individuala a densitatilor optice corespunzatoare matorului pozitiv R4a trebuie sa se situeze intre 0.300 si 1.200. Testul trebuie repetat daca cel putin una dintre valorile DO corespunzatoare lui R4a se situeaza in afara acestei limite.
$\overline{S1} < \overline{S2} < \overline{S3} < \overline{S4} < \overline{S5} < \overline{S6}$	Calculati valoarea medie a DO pentru S1 pana la S6 in urmatorul mod: $\overline{S1}$ = media a doua valori OD pentru S1 (corespunde la 0.125 EU/ml) $\overline{S2}$ = media a doua valori OD pentru S2 (corespunde la 0.25 EU/ml) etc... Semnalele standardelor trebuie sa creasca in felul urmator: $\overline{S1} < \overline{S2} < \overline{S3} < \overline{S4} < \overline{S5} < \overline{S6}$
$0.7 \leq \overline{S3/R4a} \text{ DO} \leq 1.3$	Raportul dintre $\overline{S3}$ (valoarea medie a standardului S3) si $\overline{R4a}$ (media R4a) trebuie sa se situeze intre 0.7 si 1.3

b) Interpretarea rezultatelor

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

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

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

Trasarea curbei standard:

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

Pentru reducerea automata a datelor, se utilizeaza o functie „punct-cu-punct” pentru a construi curba obtinuta din citirile valorilor DO corespunzatoare standardelor.

Poate fi furnizat un rezultat cantitativ pentru titrul anticorpilor anti-rabie dintr-o proba necunoscuta daca valoarea DO a probei se situeaza intre valorile medii ale densitatilor optice pentru S1 (0,125 EU/ml) si S6 (4 EU/ml). In acest caz, titrul probei necunoscute este determinat utilizand Curba Standard. Pe Curba Standard, gasiti valoarea corespunzatoare citirii DO a probei pe axa y si trasati o linie orizontala pana la Curba Standard. La punctul de

intersecție cu Curba Standard, trasați o linie verticală la axa x. Citiți valoarea corespunzătoare a concentrației anticorpilor în EU/ml.

Dacă valoarea DO a probei necunoscute este mai mare decât valoarea medie a Densității Optice pentru standardul S6, nu se va putea realiza o cuantificare precisă. Dacă se dorește o cuantificare precisă, realizați o diluție de cel puțin 1/10 a probei și efectuați testul din nou, pentru a obține o Densitate Optică încadrată în intervalul Curbei Standard.

Nota: O interpretare și metoda de conversie a valorilor DO în titru de anticorpi se găsesc pe CD-ul (RabiesQT-ELISA BIO-RAD – Vers.200712.A.XLS) pentru utilizatori care nu sunt echipați cu cititoare de microplaci Bio-Rad.

Explicații generale asupra rezultatelor :

Rezultate exprimate ca Densități Optice pentru probe necunoscute	Titru pentru proba necunoscută (X)	Interpretarea rezultatelor
DO proba > $\overline{S6}$	$X > 4 \text{ EU/ml}$	Nivel ridicat de seroconversie. Dacă este necesar un titru precis, proba trebuie diluată înainte de repetarea testului.
$\overline{S3} \leq \text{DO proba} \leq \overline{S6}$	$X \text{ în EU/ml (0,5 – 4 EU/ml)}$	Nivel suficient de seroconversie.
$\overline{S1} \leq \text{DO proba} \leq \overline{S3}$	$X \text{ în EU/ml (0,125-0,5 EU/ml)}$	Seroconversie insuficientă (individ neprotejat), conform testului PLATELIA™ RABIES II.
DO proba < $\overline{S1}$	-	Seroconversie nedetectabilă.

10 – LIMITELE TESTULUI

Un nivel de seroconversie insuficient sau nedetectabil poate fi raportat în cazul animalelor vaccinate recent, datorită unui răspuns imun întârziat. Similar metodei oficiale de titrare a anticorpilor neutralizanti și conform reglementării (EC) Nr. 998 / 2003 valabilă de la 3 iulie 2004, se recomandă efectuarea testului PLATELIA™ RABIES II în cazul probelor de ser prelevate cel mai curând la 30 zile după vaccinare.

11 – ECHIPAMENTE SI MATERIALE NECESARE DAR NEFURNIZATE IN TRUSA

Echipamente

- ♦ Cititor de placi prevazut cu filtre de 450 si 620 nm (*)
- ♦ Incubator de microplaci programat la $37^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$.
- ♦ Spalator de microplaci manual, semi-automat sau automat (*)
- ♦ Agitator tip Vortex

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

Materiale

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

12 – MASURI DE PRECAUTIE

1. Masuri de precautie

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

- ♦ Reactivii trebuie pastrati la o temperatura intre $+2^{\circ}\text{C}$ si $+8^{\circ}\text{C}$
- ♦ Nu folositi reactivi expirati.
- ♦ Nu combinati reactivi din loturi diferite in cadrul unei runde de testare, cu exceptia reactivilor de uz general R2, R8, R9, R10.
- ♦ Inainte de utilizare asteptati 30 minute pana cand reactivii ajung la temperatura camerei.
- ♦ Reconstituiti reactivii cu atentie, evitand orice contaminare.
- ♦ Nu efectuati testul in prezenta vaporilor reactivi (acizi, alkali, aldehide) sau a prafului care ar putea altera activitatea enzimei din cadrul conjugatului.
- ♦ Utilizati sticlari spalata cu atentie si clatita cu apa deionizata sau preferabil, consumabile de unica folosinta.
- ♦ Nu lasati microplaca sa stea mai mult de 5 minute intre sfarsitul etapei de spalare si distribuirea reactivilor in placa.
- ♦ Verificati precizia pipetarii si buna functionare a aparatului utilizat.
- ♦ Nu folositi niciodata acelasi recipient pentru distribuirea conjugatului si a solutiei de dezvoltare.

- ♦ Reactia enzimatica este foarte sensibila la prezenta metalelor sau a ionilor metalici. In consecinta, nu lasati un element metalic sa vina in contact cu solutiile de conjugat sau de substrat.
- ♦ Solutia de dezvoltare (tampon substrat + cromogen) trebuie sa fie incolora. Aparitia unei culori albastre in cateva minute de la reconstituirea solutiei de dezvoltare indica faptul ca reactivul nu poate fi utilizat si trebuie inlocuit. Prepararea acestei solutii se poate face intr-o tavita curata de plastic de unica folosinta sau intr-un recipient de sticla care a fost spalat in prealabil cu solutie de HCl 1N, si clatit bine cu apa distilata si apoi uscat. Solutia trebuie tinuta la intuneric.
- ♦ Utilizati un varf nou de pipeta pentru fiecare proba.
- ♦ Nu modificati procedura de testare.
- ♦ Spalarea godeurilor reprezinta o etapa cruciala in cadrul metodei: respectati numarul de cicluri de spalare recomandate si asigurati-va de faptul ca godeurile sunt complet umplute, iar apoi golite. Spalarea neadecvata poate genera rezultate incorecte.

2. Instructiuni de igiena si siguranta

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

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

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

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

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

- ♦ Pentru recomandari si precautii privind substantele periculoase din anumite componente ale acestei truse, va rugam sa va raportati la pictograma(ele) mentionate pe etichete si la informatiile furnizate la sfarsitul instructiunilor de utilizare. Fisa tehnica de siguranta este disponibila pe 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. *Immunochimistry* 8, 1175-1179.
6. BIDERFIELD P., GHETIE V. and SJOQUIST J. 1975. Demonstration and assaying of IgG antibodies in tissues and on cells by labelled staphylococcal protein A. *J. Immunol. Meth.* 6, 249-259.
7. BOURHY H., SUREAU P. 1989. Comparative field evaluation of the fluorescent antibody test, virus isolation from tissue culture, and enzymes immunodiagnosis for rapid laboratory diagnosis of rabies. *J. Clin. Microbiol.* 27, 519-523.
8. BRIGGS D.J., SMITH J.S., MUELLER F.L., SCHWENKE J., DAVIS R.D., GORDON C.R., SCHWEITZER K., ORCIARI L.A., YAGER P.A., RUPPRECHT C.E.. 1998. A comparison of two serological methods for detecting the immune response after rabies vaccination in dogs and cats being exported to rabies-free areas. *Biologicals* 26, 347-355.
9. CLIQUET F., AUBERT M., SAGNE L. 1998. Development of a fluorescent antibody virus neutralization test (FAVN test) for the quantitation of rabies-neutralising antibody. *J. Immunol. Methods* 212, 79-87.
10. CLIQUET F., L. SAGNE, J.L. SCHEREFFER, M.F.A. AUBERT. 2000. ELISA test for rabies antibody titration in orally vaccinated foxes sampled in the fields. *Vaccine* 18, 3272-3279.
11. CLIQUET F., VERDIER Y., SAGNE L., AUBERT M., SCHEREFFER J.L., SELVE M., WASNIEWSKI M., SERVAT A. 2003. Neutralising antibody titration in 25,000 sera of dogs and cats vaccinated against rabies in France, in the framework of the new regulations that offer an alternative to quarantine. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.* 22 (3), 857-866.
12. CLIQUET F., MÜLLER T., MUTINELLI F., BROCHIER B., AUBERT M. and all. 2003. Standardisation and establishment of a rabies ELISA test in European laboratories for assessing the efficacy of oral fox vaccination campaigns. *Vaccine* 21, 2986-2993.
13. CLIQUET F., Mc ELHINNEY L.M., SERVAT A., BOUCHER J.M., LOWINGS J.P., GODDARD T., MANSFIELD K.L., FOOKS A.R. 2004. Development of a qualitative indirect ELISA for the measurement of rabies virus-specific antibodies from vaccinated dogs and cats. *J. Vir. Methods* 117, 1-8.

14. ENGVALL E. and PERLMANN P. 1971. Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA): Quantitative assay of immunoglobulin G. *Immunochemistry* 8, 871-874.
15. FEYSSAGUET M., DACHEUX L, AUDRY L, COMPOINT A., MORIZE JL , BLANCHARD I., BOURHY 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 gglobulin. *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-PAVUNIC M., HOSTNIK P., LEVICNIK-STEZINAR S., ZALETEL-KRAGEJ 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.