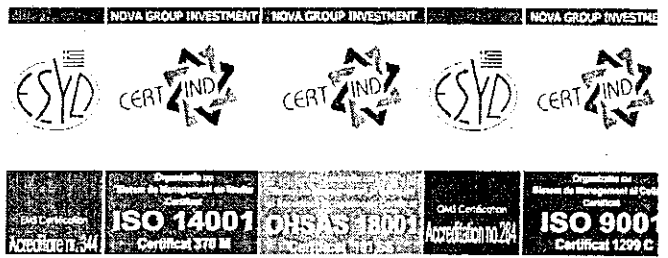


S.C. NOVA GROUP INVESTMENT S.R.L.
J40 / 6000 / 2001 , CUI : RO13986464

Str. QITUZ, nr 47 C , OTOPENI, Jud. ILFOV , ROMANIA
Tel: +(4031)425.35.15, +(4031)4253688, +(4031)4253689
Fax: + (4 031) 425.35.16
www.vetlab.ro ; E-mail: info@novagroup.ro



FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin

DENUMIRE ȘI SCOPUL UTILIZĂRII

FDI FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin se utilizeaza in procedura de imunofluorescenta directa pentru detectia rabiei *in vitro* pe probe de creier si glande submaxilare.

SUMAR ȘI PREZENTAREA TESTULUI

Testul de imunofluorescenta directa este singurul si cel mai bun test pentru diagnosticul rabiei.^{1,2} Studiile au aratat ca metoda de imunofluorescenta directa pentru detectia rabiei poate fi mai sensibila decat testul de inoculare a soarecilor; totusi, rezultatele celor doua teste sunt corelate 99-100%.^{1,3}

Anticorpilor monoclonali anti-rabie, conjugati cu *isothiocianat de fluoresceina* (FITC), sunt incubati cu tesutul presupus infectat cu virusul rabic. In prezenta virusului rabic , se vor forma complexe antigen-anticorp. Daca tesutul examinat nu contine antigen viral, complexele specifice antigen-anticorp nu se vor forma.

Complexele virus rabic -anticorpi anti-rabie sunt vizualizate folosind microscopul cu fluorescenta. Reactiile pozitive se evidentiaza printr-o fluorescenta aprinsa de mar verde a particulelor care variaza ca dimensiune și morfologie, de la marimea unei "particule de praf " pana la particule proeminente sub forma incluziunilor citoplasmice "corpusulii Negri"

Utilizarea anticorpilor monoclonali⁴ din FDI FITC ANTI-RABIES MONOCLONAL GLOBULIN ofera o colorare specifica si uniforma , cu o coloratie de fundal redusa.

Pentru a confirma specificitatea coloratiei se poate folosi suspensia adsorbanta pentru virusul rabic (RAS). Datorita specificitatii produsului **FDI FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin**, Centrul de Control al Bolilor (CDC)⁶ a sugerat eliminarea utilizarii suspensiei RAS pentru testarea de rutina. Confirmarea cu suspensia RAS este recomandata pentru probele ce au avut o reactie dubioasa la testarea cu FDI FITC ANTI-RABIES MONOCLONAL GLOBULIN cat si pentru instruirea tehnicienilor.

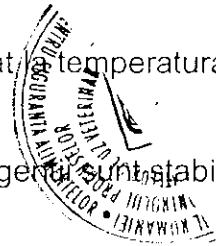
PRECAUTII

1. FDI FITC ANTI-RABIES MONOCLONAL GLOBULIN este destinat pentru diagnosticul *in vitro*. Instructiunile de utilizare trebuie respectate cu atentie.
2. Respectati procedurile de bio securitate de fiecare data cand lucrati cu material potential infectios. Se vor utiliza echipamente de protectie dedicate.
3. Toate materialele folosite in test trebuie inactivate prin incinerare sau autoclavare dupa folosire.



DEPOZITAREA ȘI VALABILITATEA REAGENTILOR

1. FDI FITC ANTI-RABIES MONOCLONAL GLOBULIN (liofilizat) trebuie pastrat la temperatura 2-8°C. Data de expirare indica depozitarea in stare liofilizata.
2. Dupa reconstituire, daca se mentine temperatura de 2-8°C si sterilitatea, reagentii sunt stabili minimum 6 luni. Se depoziteaza la intuneric.
3. Se recomanda alicotarea reagentilor reconstituiti si pastrarea acestora la -20°C. Se va evita repetarea congelarii si decongelarii.



COLECTAREA ȘI MANIPULAREA PROBELOR

1. Testul de imunofluorescenta se utilizeaza cel mai frecvent pe probe de creier si glande submaxilare. Contaminarea suprafetelor din laborator si contaminarea incrucisata a prebelor trebuie evitata cand sunt colectate probe pentru rabie..
2. Probele pentru testare (de obicei tesut din creier) se depoziteaza la 2-8°C, daca urmeaza a fi testate in 24h. Daca probele trebuie pastrate o perioada mai lunga de timp, se recomanda stocarea acestora la -70°C in flacoane sigilate la flacara sau lipite.
3. Pentru mai multe informatii specifice cu privire la colectarea probelor, impachetarea si livrarea materialelor suspecte, vezi *Lenette, E.M. si Schmidt, N.J. (eds.), Diagnostic Procedures for Viral, Rickettsial, and Chlamydial Infections, 5th Ed., 1979*, si *U>S>D>H>H>S>, Centres of Disease Control, Office of Biosafety, Packaging and Shipping Biological Materials, July 1981*.

MATERIALE INCLUSE

1. **FDI FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin** (liofilizat, contine Evans blue). Se reconstituie cu 5 ml apa distilata sau deionizata. Se lasa in repaus 30 min sau pana la dizolvare.
2. Instructiunea de utilizare al produsului.

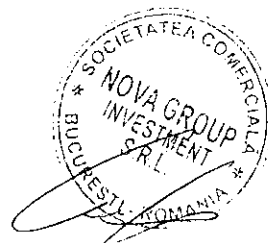
MATERIALE NECESARE DAR NEINCLUSE

1. Microscop cu fluorescenta :

Intensitatea fluorescentei poate fi influentata de tipul si starea de functionare a echipamentului utilizat –microscopul cu fluorescenta. Verificati manualul de instructiuni al producatorului pentru utilizarea filtrelor optime. Sistemele de filtre acceptabile pentru **FDI FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin** sunt prezentate in TABELUL 1.

2. Incubator ajustat la 37°C.
3. Camera umeda.
4. Vase pentru colorare.
5. Lamele (22x50 mm, grosime nr. 1).
6. Tampon fosfat salin, pH 8.5 .

Nota : Trebuie folosit gradul chimic al reagentilor.



Solutii stoc :

A. 0.85% NaCl	8.5g NaCl/1000 mL apa distilata
B. 0.067M K ₂ HPO ₄	1.16g K ₂ HPO ₄ in 100mL 0.85% NaCl
C. 0.067M KH ₂ PO ₄	0.91g KH ₂ PO ₄ in 100mL 0.85% NaCl

Solutia de lucru PBS pH 8.5

100 parti	0.067M K ₂ HPO ₄ (solutia stoc B de mai sus)
1 parte	0.067M KH ₂ PO ₄ (solutia stoc C de mai sus)

7. Glicerol tamponat, mediu pentru montare

1 parte	PBS solutie de lucru, pH 8.5
9 parti	Glicerina neutra, A.C.S.

Amestecati usor (nu agitati).

Nota : Verificati periodic pH-ul mediului pentru montare. Oxidarea glicerolului si adsorbtiia de CO₂ din aer vor scadea treptat pH-ul. Montantul se poate folosi pana la pH-ul 8.3 sau mai jos.

8. Stilou cu cerneala acrilica sau creion de ceara.

PROCEDURA TESTULUI :

A. Prepararea lamelor cu amprente (Martor si Test)

1. Lame cu amprente din creier rabic de soarece (Martor pozitiv)

- Inoculati intracerebral soareci în varsta de 3 saptamani cu 0.03 ml inocul ce contine 100 DL₅₀ virus rabic tulpina salbatica. Dupa paralizarea soarecelui se fac amprente din creier.
- Indepartati intregul creier; asezati-l pe o spatula de lemn. Indepartati zonele anterioara si posterioara a creierului; pentru prepararea amprentelor utilizati sectiunile centrale (suprafata posterioara)
- Preparati doua amprente de creier pe lama prin atingerea usoara a sectiunii transversale a creierului pe aceasta. Pregatiti maxim 100 amprente per creier. Lasati lamele 30 de minute la temperatura camerei pentru a se usca.
- Fixati amprentele in acetona racita la -20°C timp de 4 h.
- Dupa fixare, lamele se usuca si se depoziteaza la temperaturi sub -60°C
- Lamele trebuie aduse la temperatura camerei inainte de a se colora pentru imunofluorescenta.

2. Lame cu amprente din creier normal de soarece (Martor negativ)

- Folositi soareci de 3 saptamani pentru prepararea frotiurilor cu amprente
- Urmariti pasii (b) pana la (f) din procedura de preparare a lamelor cu amprente din creier rabic de soarece (martor pozitiv).

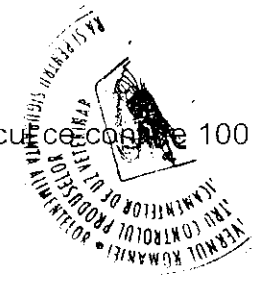
3. Lame cu amprente Test (de obicei creier)

- Ampreentele trebuie facute din urmatoarele zone ale creierului : se folosesc ambele emisfere cerebrale : medulla (trunchi cerebral), cerebel si hipocamp.
- Preparati doua amprente per lama pentru fiecare proba prelevata asa cum este descris la pasii (c) pana la (f) pentru Lamele cu amprente din creier rabic de soarece (Martor pozitiv).

B. Prepararea Suspensiei Adsorbante din Creier de Soarece

1. Suspensie 20 % din creier de soarece cu virus rabic fix (RMB)

- Inoculati soriceii în varsta de 3 saptamani, intracerebral, cu 0.03 ml inocule ce conține 100 DL₅₀ virus rabic CVS
- Cand animalul este muribund, prelevati aseptice creierul.
- Cantariți creierul și pregatiti o suspensie 20% (greutate/volum) in solutia PBS de lucru, continand 0.75% albumina serica bovina fractiunea V .
- Asezati proba de creier și diluantul BSA in cupele omogenizatorului cu capac filetant și imersati cupele in baie de gheata. Omogenizati materialul prin procesare de doua ori, timp de 1 minut la viteza maxima, apoi lasati omogenatul in repaus (nedeschis) timp de 30 minute in baie de gheata.
- Centrifugati la 330 x g timp de 20 min.
- Suspensia se titreaza prin inocularea intracerebrala la soareci de 3 saptamani. Suspensile cu titru DL₅₀=10^{-5.5} sau mai mari per 0.03 ml sunt acceptabile. Se depoziteaza la -70°C.



2. Suspensie 20% din creier de soarece (NMB)

- Folositi probe de creier normal de la soareci de 3 saptamani.
- Urmariți pasii (c) pana la (e) (omitand pasul f) dati la prepararea suspensiei din creier rabic de soarece.

C. Procedura de colorare

1. Scoateti din frigider lamele pozitive, negative și cele cu amprenta test și aduceți-le la temperatura camerei.

2. Incercuiti fiecare amprenta cu stiloul cu cerneala acrilica sau cu creionul cu ceara.

3. Reconstituiti flaconul cu **FDI FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin** dupa indicatiile din prospect. Conjugatul trebuie utilizat nediluat. (Trebuie facuta o titrare preliminara pentru a se asigura cel puțin o dilutie zecimala in plus de anticorpi)

4. Colorarea lamelor utilizand Suspensia Adsorbanta Rabica (RAS):

- Scoateti suspensiile din creier rabic și creier normal de soarece din frigider și aduceți-le la temperatura camerei.
- Preparati dilutia 1:5 a conjugatului în RAS și NMB, apoi incubati la temperatura camerei 30 minute.
- Pe fiecare lama Martor și Test, acoperiti o amprenta cu dilutia conjugatului preparata in creier normal de soarece; acoperiti cealalta amprenta cu dilutia de conjugat preparata in creier rabic de soarece.
- Incubati in camera umeda la 37°C timp de 30 min.

5. Colorarea lamelor Fara utilizarea Suspensiei adsorbante rabice (RAS) :



- a. Acoperiti fiecare amprenta cu conjugat diluat 1:5 in PBS 0.75% albumina serica bovina fractiunea V.
- b. Incubati in camera umeda la 37°C timp de 30 min.

6. Indepartati conjugatul in exces de pe suprafata lamelor printr-o scurta clatire cu solutia PBS de lucru. Apoi, spalati lamele timp de 10 minute cu solutia PBS de lucru. In aceasta etapa schimbati o data solutia de lucru PBS.

7. Spalati o data, scurt, cu apa distilata pentru a indeparta sarurile

8. Lasati sa se usuce la aer.

9. Montati lamele cu mediul de montare Glicerol tamponat.

10. Examinati lamele la microscopul cu fluorescenta in decurs de 2 h.

D. Stabilitatea reactiei finale

1. Montati doar acele lame care pot fi citite in decurs de 2 h. Daca citirea nu se poate realiza in maxim 2 h, depozitati lamele nemontate la 4°C,

E. Citirea lamelor Test

1. Pentru lamele test colorate utilizand suspensia adsorbanta din creier rabic de soarece

- a. Examinati amprentele test colorate cu **FDI FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin** diluat in suspensie din creier normal de soarece (NMB), folosind microscopul cu fluorescenta.
- b. Apoi, examinati amprentele test colorate cu **FDI FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin** diluat in suspensie din creier rabic de soarece (RMB).
- c. Daca apare fluorescenta stralucitoare cu aspect mar verde in prima amprenta (adsorbita cu suspensie din creier normal de soarece) ca si la Martorul pozitiv, iar colorarea este diminuatata la cea de-a doua amprenta (adsorbita cu suspensie din creier rabic de soarece), lama test este pozitiva.
- d. Daca nu apare fluorescenta verde stralucitoare specifica in nici o amprenta, lama test este negativa. (Vezi **Limitele procedurii**).
- e. Daca apare fluorescenta asemanatoare in ambele amprente colorate, adsorbite cu conjugat NMB si conjugat RMB, reactia nu poate fi considerata pozitiva. (Vezi **Limitele procedurii**).

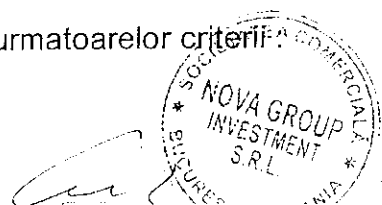
2. Pentru lamele test colorate fara utilizarea suspensiei adsorbante

- a. Examinati amprentele Test si amprentele Martor pozitiv si Martor negativ colorate cu **FDI FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin**, folosind microscopul cu fluorescenta.
- b. O amprenta test este considerata pozitiva daca se observa o fluorescenta stralucitoare mar verde. Testul este valid daca fluorescenta verde stralucitoare este observata la Martorul pozitiv si absenta la Martorul negativ.
- c. Ampretele test sunt considerate negative, daca nu apare fluorescenta. Testul este valid daca fluorescenta verde stralucitoare este observata in controlul pozitiv si absenta in controlul negativ.
- d. Se recomanda repetarea lamelor test suspecte, utilizand metoda suspensiei adsorbante pentru virusul rabic.

3. Rezultatele pot fi raportate folosind valorile semicantitative.

Lamele cu amprente (martor si test) sunt apreciate pe baza urmatoarelor criterii:

- o Intensitatea coloratiei specifice virusului rabic



- o Cantitatea de antigen a virusului rabic colorat
- o Intensitatea si cantitatea coloratiei non-specifice
 - a. Intensitatea fluorescentei (specifica si non-specifica) este evaluata pe o scara de la negativ la +4, dupa cum urmeaza :
 - 4+ =fluorescenta stralucitoare cu aspect de mar verde
 - 3+ =fluorescenta luminoasa cu aspect de mar verde
 - 2+ =fluorescenta slaba cu aspect de mar verde
 - 1+ =fluorescenta foarte slaba dar detectabila cu aspect de mar verde
 - Negativ =nu apare fluorescenta cu aspect de mar verde
(poate aparea autofluorescenta albastra-gri a tesutului)
 - b. Cantitatea de antigen rabic colorat este, de asemenea evaluata pe o scara de la negativ la 4+, dupa cum urmeaza :
 - 4+ =antigen prezent in aproximativ 100% din campurile microscopice examinate per amprenta
 - 3+ = antigen prezent in aproximativ 75% din campurile microscopice examinate per amprenta
 - 2+ = antigen prezent in aproximativ 50% din campurile microscopice examinate per amprenta
 - 1+ = antigen prezent in aproximativ 25% din campurile microscopice examinate per amprenta
 - Negativ =antigenul virusului rabic este absent in toate campurile microscopice examinate per amprenta

Confirmarea cu ajutorul Suspensiei adsorbante pentru rabie (RAS)

Pentru testul ce utilizeaza **FDI FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin**, Centrul de Control al Bolilor⁶ a sugerat eliminarea testarii de rutina cu RAS. Pentru un diagnostic complet nu este necesara raportarea impreuna cu RAS pentru fiecare proba negativa sau cert pozitiva (4+ intensitate si 3+/4+ distributie antigen). Pentru celelalte probe, testul ar trebui repetat cu RAS.

F. Controlul de calitate

Evaluati coloratia specifica pe lame din creier de soarece infectat cu virus rabic (martor pozitiv) si coloratia nespecifica pe lame din creier normal de soarece (martor negativ).

1. Martor pozitiv

- a. Examinati amprentele colorate cu **FDI FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin** diluat in suspensie din creier normal de soarece. Intensitatea colorarii specifice ar trebui sa fie 4+ si cantitatea de antigen colorat 4+.
- b. Apoi, examinati amprentele colorate cu **FDI FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin** diluat in suspensie din creier de soarece cu virus rabic. Coloratia specifica ar trebui sa fie semnificativ redusa deoarece anticorpul conjugat reactioneaza cu antigenul rabic din suspensie si nu cu antigenul rabic din amprenta.
- c. **DACA ACESTE REZULTATE NU APAR, TESTUL ESTE INVALID.**

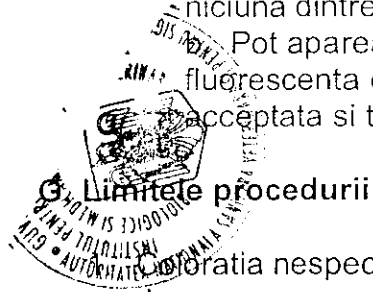
2. Martor negativ

- a. Examinati amprentele colorate cu **FDI FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin** diluat in suspensie din creier normal de soarece si suspensie din creier de soarece



infectat cu virus rabic. Nu trebuie sa apara fluorescanta cu aspect de mar verde la niciuna dintre aceste doua amprente.

Pot aparea anumite tipuri de coloratie nespecifica (Vezi Limitele procedurii). Orice fluorescanta care nu poate fi diferentiata de fluorescanta specifica rabiei, nu poate fi acceptata si testul este considerat invalid.



Coloratia nespecifica poate aparea din cauza anticorpilor marcati cu fluoresceina precipitati de asemenea, mai poate aparea din cauza reactiilor cu leucocitele si anumite tipuri de tesuturi conexe si incluziuni (corpi). Aceste reactii se pot diferentia morfologic de colorarea specifica a virusului rabic.

2. Inocularea soarecilor sau inocularea culturilor celulare de neuroblastome de soarece, trebuie folosita pentru confirmarea rezultatelor incerte, mai ales in cazurile de posibila expunere umana.
3. Confirmarea cu RAS

Pentru un diagnostic complet nu este necesara raportarea impreuna cu RAS pentru fiecare proba negativa sau cert pozitiva (4+ intensitate si 3+/4+ distributie antigen). Pentru celelalte probe, testul ar trebui repetat cu RAS.

H. Rezultate asteptate

FDI FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin reactioneaza cu toate tipurile de rabie si virusurile inrudite cu aceasta, dupa cum este prezentat in TABEL 2.

TABEL 1. FITC SISTEME DE FILTRARE

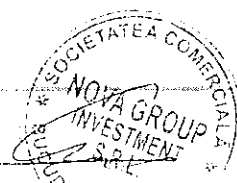
LUMINA FLUORESCENTA TRANSMISA

Sursa de lumina	Filtru excitator	Filtru bariera
Mercury Vapor 200 W, 50 W	KP 490 + BG 38 (4 mm) sau BG 12 (4 mm) +BG 38 (4 mm)	K510, K530
Tungsten-Halogen 50W, 100W	KP 490 + BG 38 (4 mm)	K510, K515, K530

Nota : Bulbii Tungsten-Halogen trebuie folositi in conjunctie cu un cap de microscop monocular.

LUMINA INCIDENTA FLUORESCENTA

Sursa de lumina	Filtru excitator	Dichroic Beam Splitting Mirror	Filtru bariera
Mercury Vapor 200 W, 100W, 50 W	KP 500 + BG 38 (4 mm) sau BG 23 (4 mm) pentru o puternica supresie rosie. Filtru de margine 450 nm, 480 nm pentru ingustarea si excitarea benzii si supresia autofluorescentei	TK 510	K510, K530

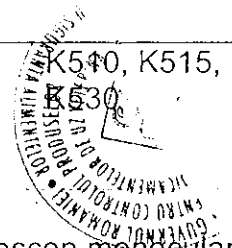


tisulare.

Tungsten-Halogen
100W

KP 500 + BG 38 (4 mm)

TK 510



Nota : Bulbii Tungsten-Halogen trebuie folositi in conjunctie cu un cap de microscop monocular.

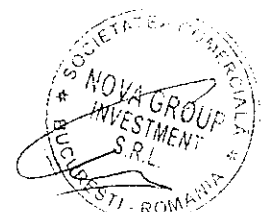
TABEL 2. VIRUSURI DETECTATE DE FDI FITC ANTI-RABIES MONOCLONAL GLOBULIN

Grup	Tulpina	Coloratie fluorescenta cu FDI FITC ANTI-RABIES MONOCLONAL GLOBULIN
Rabie	Tulpini salbatice si fixe	+
Inrudite cu Rabia	Duvenhage	+
	Lagos Bat	+
	Mokola	+

BIBLIOGRAFIE

1. The World Health organization, 1996. *Laboratory Techniques in Rabies*, Monograph Series No. 23, Second edition.
2. The World Health Organization, 1966. WHO Expert Committee on Rabies. Technical report Series No. 312, Fifth edition.
3. McQueen, J.L., Lewis, A.L., and Schneider, N.J., 1960. Rabies Diagnosis by Fluorescent Antibody. Its Evaluation in a Public Health Laboratory. *Amer. J. Publ. Hlth.* 50 :1743-1752.
4. Wiktor, T.J. and Koprowski, H. 1978. Use of Monoclonal Antibodies in Diagnosis of Rabies Virus Infection and Differentiating of Rabies and Rabies-Related Viruses. *J. Virol Methods.* 1 :1-10.
5. Letter on file at FDI from George M. Baer, D.V.M., Centers for Disease Control, Lawrenceville Facility. April 20, 1987.

Producator
Fujirebio Diagnostics, Inc.
201 Great Valley Parkway
Malvern, PA 19355
U.S.A.





REF

800-092



100

FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin

Pentru Diagnostic in Vitro
A Rabiei din probe de creier sau
glande submaxilare prin metoda de
fluorescenta directa prin utilizarea
anticorpilor monoclonali marcati cu
FITC

CONȚINUT

1 Flacon Anticorpi
Monoclonali anti Rabie
marcati cu FITC
(Liofilizat, a se reconstitui
cu 5.0mL apa distilata)



Fujirebio Diagnostics, Inc., Malvern, PA 19355


523322
APR/2014

FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin

000-926 4/04

CONJUGAT

Liofilizat, a se reconstitui
cu 5.0mL apa distilata

LOT

EXP DATE



IVD



2 C



REF

200 646