

FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin

DENUMIRE ȘI SCOPUL UTILIZĂRII

FDI FITC ANTI-RABIES MONOCLONAL GLOBULIN este utilizat în procedura de imuno fluorescența directă pentru detectia *in vitro* a rabiei în creier și glandele submaxilare.

PRINCIPIUL ȘI PREZENTAREA TESTULUI

Testul de imunofluorescența directă este singurul și cel mai bun test pentru diagnosticul rabiei.^{1,2} Studiile au arătat că metoda de imunofluorescența pentru detectia rabiei poate fi mai sensibilă decât testul de inoculare a soarecilor; totuși, rezultatele celor două teste sunt corelate 99-100%.^{1,3}

Anticorpii monoclonali anti-rabie, conjugați cu *isothiocyanate fluorescein* (FITC), sunt incubati cu tesutul presupus infectat cu virusul rabic. În prezența virusului rabic, se vor forma complexe antigen-anticorp. Dacă tesutul supus examinării nu conține antigen viral, nu se vor forma complexe antigen-anticorp specifice.

Complexele virus rabie-anticorpi anti- virus rabie sunt vizualizate folosind microscopul cu fluorescența. Reacțiile pozitive sunt evidențiate printr-o fluorescență aprinsă de mar verde a particulelor care variază ca mărime și morfologie de la "particule de praf" până la incluzii citoplasmice proeminente "corpusulii Negri".

Utilizarea anticorpilor monoclonali⁴ din FDI FITC ANTI-RABIES MONOCLONAL GLOBULIN oferă o colorație specifică și uniformă, cu o colorație pe fond redusă.

Pentru a confirma specificitatea colorației se poate folosi suspensia adsorbantă pentru virusul rabic (RAS). Datorită specificității produsului FDI FITC ANTI-RABIES MONOCLONAL GLOBULIN, Centrul de Control al Bolilor (CDC)⁶ a sugerat eliminarea suspensiei RAS pentru testarea de rutină. Confirmarea cu suspensia RAS este recomandată pentru probele suspecte la testarea cu FDI FITC ANTI-RABIES MONOCLONAL GLOBULIN și pentru instruirea tehnicienilor.

PRECAUTII

1. FDI FITC ANTI-RABIES MONOCLONAL GLOBULIN este destinat pentru diagnosticul *in vitro*. Instrucțiunile de utilizare trebuie respectate cu atenție.
2. Respectați procedurile de siguranță de fiecare dată când lucrați cu material potențial infecțios. Trebuie folosite haine de protecție adecvate.
3. Toate materialele folosite trebuie inactivate prin incinerare sau autoclavare după folosire.

DEPOZITAREA ȘI VALABILITATEA REAGENTILOR

1. FDI FITC ANTI-RABIES MONOCLONAL GLOBULIN (liofilizat) trebuie păstrat la temperatura 2-8°C. Data de expirare indică depozitarea în stare liofilizată.
2. După reconstituire, dacă produsul este menținut la temperatura de 2-8°C, iar sterilitatea se păstrează, reagenții sunt stabili pentru cel puțin 6 luni. Depozitați la întuneric.



3. Se recomanda depozitarea reagentilor reconstituiti alicotati la -20°C. Evitati congelari si decongelari repetate.

PRELEVAREA ŞI MANIPULAREA PROBELOR

1. Testul de imunofluorescenta se utilizeaza cel mai frecvent pe probe de creier si glande submaxilare. In timpul colectarii probelor pentru rabie, trebuie evitata contaminarea suprafetelor din laborator si contaminarea încrucisata a probelor.

2. Probele pentru testare (de obicei tesut din creier) se depoziteaza la 2-8°C, daca urmeaza a fi testate în 24 ore. Daca probele trebuie pastrate o perioada mai lunga de timp, se recomanda pastrarea acestor 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 *Lennette, 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. Lasati in repaus 30 minute sau pana la dizolvare.

2. Instructiuni de utilizare a produsului.

MATERIALE NECESARE CARE NU SUNT INCLUSE

1. Microscop cu fluorescenta :

Intensitatea fluorescentei poate fi influentata de tipul si starea de functionare a echipamentului de fluorescenta folosit. Verificati manualul de instructiuni al producatorului pentru filtrele optime. Sistemele de filtre acceptabile pentru FDI FITC ANTI-RABIES MONOCLONAL GLOBULIN sunt prezentate in TABEL 1.

2. Incubator ajustat la 37°C.

3. Camera umeda.

4. Vase pentru colorare.

5. Lamele de acoperire (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 K₂HPO₄

1.16g K₂HPO₄ in 100ml 0.85% NaCl

C. 0.067M KH₂PO₄

0.91g KH₂PO₄ in 100ml 0.85% NaCl

Solutia de lucru PBS, pH 8.5

100 parti

0.067M K₂HPO₄ (solutia stoc **B** de mai sus)

1 parte

0.067M KH₂PO₄ (solutia stoc **C** de mai sus)



7. Mediu pentru montare glicerol tamponat

1 parte
9 parti

PBS solutie de lucru, pH 8.5
Glicerina neutra, A.C.S.

Amestecati usor (nu agitati).

Nota : verificati periodic pH-ul mediului pentru montare. Oxidarea glicerolului si adsorbtia 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 virus rabic 100 LD₅₀. Dupa paralizarea soarecelui se fac amprente din creier.
- Indeprtati intregul creier; asezati-l pe o spatula de lemn. Indeprtati aria anterioara si posterioara a creierului ; pentru prepararea amprentelor folositi sectiunile centrale (suprafata posterioara)
- Preparati doua amprente de creier per lama prin atingerea usoara a sectiunii transversale a creierului pe aceasta. Pregatiti maxim 100 amprente per creier. Lasati lamele 30 de min la temperatura camerei pentru a se usca.
- Fixati amprente in acetona racita la -20°C timp de 4 ore.
- Dupa fixare, uscati lamele si depozitati-le la -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
- Urmarii 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 © pana la (f) pentru lamele cu amprente din creier rabic de soarece (control pozitiv).

B. Prepararea suspensiei adsorbante din creier de soarece

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

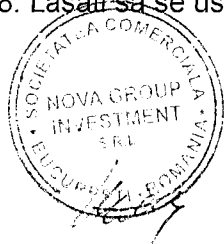
- Inoculati intracerebral soriceii în varsta de 3 saptamani cu 0.03 ml inocul ce contine 100 LD₅₀
- Cand animalul este muribund, prelevati aseptice creierul.



- c. Cantariti cereierul si pregatiti suspensie 20% (greutate/volum) in solutia PBS de lucru, continand 0.75% albumina serica bovina fractiunea V.
 - d. Asezati proba de creier si diluantul BSA in cupele omogenizatorului cu capac filetant si 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.
 - e. Centrifugati la 330 x g timp de 20 min.
 - f. Titrati suspensia la soareci de 3 saptamani, intracerebral. Suspensiile cu titru $LD_{50}=10^{-5.5}$ sau mai mari de 0.03 ml sunt acceptabile. Depozitati la $-70^{\circ}C$.
2. Suspensie 20% din creier normal de soarece (NMB)
- a. Folositi probe de creier normal de la soareci de 3 saptamani.
 - b. Urmarii 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 si cele cu amprenta test si aduceti-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 folosit nediluat. (Trebuie facuta o titrare preliminara pentru a se asigura cei putin de 10 ori anticorpi in exces.)
4. Colorarea lamelor folosind Suspensia Adsorbanta Rabica (RAS):
 - a. Scoateti suspensiile din creier rabic si creier normal de soarece din frigider si aduceti-le la temperatura camerei.
 - b. Preparati dilutia 1 :5 a conjugatului in RAS si NMB, apoi incubati la temperatura camerei 30 minute.
 - c. Pe fiecare lama Martor și Test, acoperiti o amprenta cu dilutia conjugatului preparata in creier normal de soarece ; acoperiti celalta amprenta cu dilutia de conjugat preparata in creier rabic de soarece.
 - d. Incubati in camera umeda la $37^{\circ}C$ timp de 30 minute.
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 $37^{\circ}C$ timp de 30 minute.
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 PBS de lucru.
7. Spalati, o data si rapid cu apa distilata pentru a indeparta sărurile.
8. Lasati sa se usuce la aer.



9. Montati lamelele peste mediul de montare cu glicerol tamponat.

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

D. Stabilitatea reactiei finale

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

E. Citirea lamelor Test

1. Pentru lamele test colorate cu suspensie adsorbanta pentru rabie

- a. Examinati amprentele test colorate, ce contin 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 de soarece infectat cu virus rabic (RMB).
- c. Daca apare fluorescenta stralucitoare cu aspect de mar verde in prima amprenta (adsorbita cu suspensie din creier normal de soarece) ca si in Martorul pozitiv, iar colorarea este diminuată la cea de-a doua amprenta (adsorbita cu suspensie din creier de soarece infectat cu virus rabic), 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 amprente Test si amprente ce contin controlul pozitiv si controlul negativ colorate cu FDI FITC ANTI-RABIES MONOCLONAL GLOBULIN, folosind microscopul cu fluorescenta.
- b. O amprenta test este considerata pozitiva daca se observa fluorescenta stralucitoare de mar verde. Testul este valid daca fluorescenta verde stralucitoare este observata in controlul pozitiv si absenta in controlul negativ.
- c. Amprentele 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, folosind metoda suspensiei adsorbante pentru virusul rabic.

3. Rezultatele pot fi raportate folosind valorile semicantitative.

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

- Intensitatea coloratiei specifice virusului rabic
- Cantitatea de antigen a virusului rabic colorat
- 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 cu aspect de mar verde



Negativ =nu apare fluorescenta cu aspect de mar verde
(poate apare 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 a 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 a lamelor cu creier de soarece infectat cu virus rabic (control pozitiv) si colorarea nespecifica a lamelor cu creier normal de soarece (control 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. Colorarea specifica ar trebui sa fie semnificativ redusa deoarece anticorpii conjugati 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 de creier normal de soarece si suspensie de creier de soarece infectat cu virus rabic. Nu trebuie sa apara fluorescenta la niciuna dintre aceste doua amprente.
- b. Pot apare anumite tipuri de colorare nespecifica (Vezi Limitele procedurii). Orice fluorescenta care nu poate fi diferentiata de fluorescenta specifica rabiei, nu poate fi acceptata si testul este considerat invalid.

G. Limitele procedurii

1. Colorarea nespecifica poate apare din cauza anticorpilor marcati cu fluoresceina precipitati ; de asemenea, mai poate apare din cauza reactiilor cu leucocitele si anumite



- tipuri de tesuturi conexe si incluzii (corpi). Aceste reactii se pot diferentia morfologic de colorarea specifica a virusului rabic.
- Inocularea soarecilor sau inocularea culturilor celulare de neuroblastome de soarece, trebuie folosita pentru confirmarea rezultatelor incerte, mai ales in cazurile de posibila expunere umana.
 - Confirmarea se face cu RAS
Nu este necesara tesarea cu RAS pentru fiecare specimen, negative sau fals pozitive (4+ intensitate si 3+/4+ distributia antigenelor) pentru a raporta un diagnostic complet. Toate celelalte probe, totusi, trebuie confirmate folosind RAS.

H. Rezultate asteptate

FITC ANTI-RABIES MONOCLONAL GLOBULIN reactioneaza cu toate tipurile de rabie si virusurile inrudite cu acesta, 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 tisulare.	TK 510	K510, K530
Tungsten-Halogen 100W	KP 500 + BG 38 (4 mm)	TK 510	K510, K515, K530

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	Colorare fluorescenta cu FDI FITC ANTI-RABIES MONOCLONAL GLOBULIN
Rabie	Tulpini mobile si imobile	+
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.

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



FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin

FITC Anti-Rabies Monoclonal Globulin

LOT 309077

2018-10-26



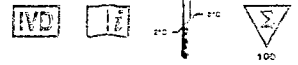
(01) 00850212007003 GTIN
 (10) 309077 BATCH/LOT
 (17) 181028 EXPIRY / DATA EXPIRARE
 (240) 800-092 CAT NUMBER
 (422) 840 ORIGIN US

Pentru Diagnostic In Vitro
 A Rabiei din probe de creier sau glande submaxilare
 prin metoda de fluorescena directa prin utilizarea
 anticorpilor monoclonali marcați cu FITC

CONJUGATE 1 Flacon Anticorpi Monoclonali anti Rabie
 marcați cu FITC
 (Liofilizat, e se reconstituie cu 5.0mL apa distilata)



Fujirebio Diagnostics, Inc.
 Seguin, TX 78155
 093307.00 Rev 000 9/15



REF 800-092



Warning: Contains Sodium Azide
 Harmful: See Package Insert for full hazard information

325897
 2018-10-26
FITC Anti-Rabies
Monoclonal Globulin
 CONJUGATE Liofilizat, e se reconstituie cu 5.0mL apa distilata
 Warning: Contains Azide See Package Insert
 LOT 309077
 REF 800-092
 093307.00 Rev 000

