



МИНСЕЛЬХОЗ РОССИИ
ФГБНУ "ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ТОКСИКОЛОГИЧЕСКОЙ, РАДИАЦИОННОЙ
И БИОЛОГИЧЕСКОЙ БЕЗОПАСНОСТИ" (ФГБНУ "ФЦТРБ - ВНИВИ")
№ РОСС RU.СС07.Д00270

«Для ветеринарного
применения»

НАБОР ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ БЕШЕНСТВА МЕТОДОМ ИММУНОФЛУОРЕСЦЕНЦИИ

- флуоресцирующий антирабический глобулин, 0,5 см³, раб. разв. 1:16, 6 амл.
- контрольный флуоресцирующий глобулин, 0,5 см³, раб. разв. 1:16, 2 амл.
- антирабический глобулин, 0,5 см³, раб. разв. 1:8, 2 амл.

ТУ 21.10.60-001-00492374-2017

Серия №
Контроль №

Дата изготовления
Срок годности 24 мес.

Хранить в сухом и темном
месте при +2-10°C

УТВЕРЖДАЮ:

Директор ФГБНУ «Федеральный
центр токсикологической,
радиационной и биологической
безопасности»

А.И. Никитин

« 7 »



ИНСТРУКЦИЯ

по применению «Набора для лабораторной диагностики бешенства
методом иммунофлуоресценции»

(Организация-разработчик: ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической,
радиационной и биологической безопасности», 420075, г. Казань,
Научный городок-2)

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. «Набор для лабораторной диагностики бешенства методом
иммунофлуоресценции».

2. В состав набора входят:

- флуоресцирующий антирабический глобулин (ФАГ) – 6 ампул (по 0,5 см³);
- контрольный флуоресцирующий глобулин (КФГ), – 2 ампулы (по 0,5 см³);
- антирабический глобулин (АНГ) – 2 ампулы (по 0,5 см³).

3. По внешнему виду ФАГ, КФГ представляют собой сухую пористую массу от светло-желтого до желтовато-оранжевого цвета, АНГ - сухую пористую массу от серого до белого цвета, растворимые в дистиллированной воде в течение 1-3 мин;

4. ФАГ, КФГ и АНГ расфасовывают в ампулы по 0,5 см³ с указанием на этикетке наименования организации-производителя, наименования компонента, количества его в ампуле (см³), номера серии и контроля, рабочего разведения, срока годности; укладывают в картонные коробки с разделительными перегородками по ГОСТ 12301-2006. На этикетке коробки

должно быть указано: наименование и товарный знак организации-производителя, наименование набора, номер серии, номер контроля, рабочее разведение компонентов набора, количество каждого компонента (ампул) в коробке, количество препарата в ампуле, дата изготовления (месяц, год), срок годности, условия хранения и обозначение ТУ. В коробку вкладывают инструкцию по применению набора.

ФАГ с контрольными препаратами рассчитан на проведение исследования 50 проб (200 мазков или мазков-отпечатков).

5. Ампулы с ФАГ, КФГ и АНГ хранят в сухом темном месте при температуре от 2 до 10⁰С. Срок годности набора 24 мес с даты изготовления.

При изменении цвета компонентов набора, консистенции или плохой растворимости применение его прекращают. Ампулы с препаратом, содержащие посторонние примеси, с нарушением целостности, а также с истекшим сроком годности бракуют. Бракованные препараты подлежат утилизации автоклавированием при 1,0-1,5 атм. (120-127⁰С) в течение 1 ч.

II. ПРИНЦИП МЕТОДА

6. Принцип метода иммунофлуоресценции основан на визуальном учете специфического взаимодействия флуоресцирующих антирабических антител с гомологичным рабическим антигеном. Образующийся при этом комплекс "антиген-антитело", меченное флуорохромом, обнаруживается по характерному свечению в видимых фиолетово-синих лучах люминесцентного микроскопа.

7. В контрольных препаратах из мозговой ткани, содержащих вирус бешенства, обработанных последовательно антирабическим глобулином, а затем флуоресцирующим антирабическим глобулином специфическое свечение должно быть подавлено (реакция подавления иммунофлуоресценции). В препаратах, обработанных контрольным флуоресцирующим глобулином, специфическое свечение должно отсутствовать.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

8. Набор для лабораторной диагностики бешенства методом иммунофлуоресценции предназначен для обнаружения антигена вируса бешенства в отпечатках с роговицы глаз, в патологическом материале - головном мозге подозреваемых на заболевание бешенством.

9. Подготовка исследуемого материала к работе.

Отбор и направление патологического материала проводят согласно действующим санитарным и ветеринарным правилам (СП 3.1.096-96 и ВП 13.3.1103-96). Для диагностики бешенства приготавливают отпечатки или

мазки из различных участков свежего или свежемороженого головного мозга (аммоновы рога, мозжечок, кора больших полушарий, продолговатый мозг и др.) на тщательно обезжиренных предметных стеклах. С каждого участка мозга делают не менее двух отпечатков или мазков на предметных стеклах.

10. Приготовление отпечатков.

Из вышеуказанных отделов мозга вырезают кусочки ткани и кладут на фильтровальную бумагу, сложенную в 4-6 слоев. К поверхности среза 3-4 раза прикасаются предметным стеклом, слегка надавливая его, до получения на стекле тонкого отпечатка.

11. Приготовление мазков.

Мазки делают из тех же участков головного мозга. Для этого кусочек мозга растирают в фарфоровой ступке пестиком до образования гомогенной массы, из которой круговыми движениями пестиком делают тонкие мазки на предметных стеклах.

12. Подготовка контрольных препаратов.

Для контроля делают мазки или отпечатки из мозга здоровых не болевших бешенством и не вакцинированных против бешенства белых мышей, как описано в пп. 10 и 11.

После приготовления мазки или отпечатки высушивают на воздухе, фиксируют в охлажденном ацетоне при $+4^{\circ}\text{C}$ в течение 4-х ч или при -20°C в течение 1 ч, после чего извлекают из ацетона и высушивают на воздухе, отмечают границу исследуемого материала на стекле восковым карандашом.

13. Подготовка реагентов

Приготовление 0,01М фосфатно-буферного раствора (ФБР), pH $7,4\pm 0,2$:

Основной раствор 1. 10 г двузамещенного фосфорнокислого натрия ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$), 1 г однозамещенного фосфорнокислого калия (KH_2PO_4) растворяют в 1000 см^3 дистиллированной воды.

Основной раствор 2. 8,5 г хлористого натрия растворяют в 1000 см^3 дистиллированной воды и фильтруют.

Смешивают 180 см^3 основного раствора 1 и 900 см^3 основного раствора 2; pH полученного раствора должно быть $7,4\pm 0,2$. При необходимости pH корректируют добавлением 0,1М раствора КОН или HCl. Приготовленные растворы 1, 2 и 0,01М ФБР применяют в работе в течение 2-х мес при температуре хранения их $5\pm 2^{\circ}\text{C}$. 0,01М ФБР, pH 7,2-7,4, используют для разведения компонентов набора и промывания стекол после окрашивания.

Сухие ФАГ, КФГ и АнГ растворяют в стерильной дистиллированной воде, объем раствора доводят до указанного на этикетке ампулы первоначального объема и используют в работе в течение двух недель при температуре хранения $5\pm 2^{\circ}\text{C}$. Необходимое для исследования количество растворенного ФАГ, КФГ и АнГ дополнительно разводят 0,01М ФБР, pH $7,4\pm 0,2$, до рабочего разведения, указанного на этикетке ампулы, и используют в день приготовления.

Подготовка предметных стекол.

Препараты из исследуемого материала приготавливают на обезжиренных предметных стеклах.

Новые предметные стекла заливают смесью спирта-эфира (1:1) на 10 мин., протирают марлевым тампоном, не касаясь поверхности пальцами, и ополаскивают в 1-2 порциях свежей смеси спирта-эфира и хранят в указанной смеси. Перед использованием стекла вынимают и высушивают на воздухе.

14. Проведение исследования

Для исследования берут мазки или отпечатки, помещают во влажную камеру (например, чашку Петри или кювет с увлажненным дном). Затем наносят от $0,05\text{см}^3$ до $0,1\text{ см}^3$ ФАГ в рабочем разведении равномерно на всю поверхность мазка или отпечатка при помощи пипетки, закрывают камеру с препаратами, помещают в термостат при $37\pm 1^\circ\text{C}$ и выдерживают 30 мин. Параллельно окрашивают контрольные препараты.

15. Для контроля специфичности свечения комплекса “антиген-антитело” на фиксированные препараты, приготовленные из исследуемых участков головного мозга, наносят при помощи пипетки АНГ в рабочем разведении, указанном на этикетке, выдерживают их в течение 30 мин во влажной камере в термостате при $37\pm 1^\circ\text{C}$. Затем препараты ополаскивают дистиллированной водой и промывают трехкратно, погружая их каждый раз на 10 мин в сосуд с $0,01\text{М}$ ФБР, рН $7,4\pm 0,2$, после чего высушивают на воздухе и окрашивают флуоресцирующим антирабическим глобулином, как описано в п. 14.

16. Для контроля специфичности комплекса “антиген-антитело” на фиксированные препараты, приготовленные из исследуемых участков головного мозга, наносят при помощи пипетки КФГ в рабочем разведении, указанном на этикетке, выдерживают во влажной камере в термостате при $37\pm 1^\circ\text{C}$ в течение 30 мин.

17. После окончания окрашивания стекла ополаскивают дистиллированной водой и промывают трехкратно, погружая их каждый раз на 10 мин в сосуд с $0,01\text{М}$ ФБР, рН $7,4\pm 0,2$. Затем препараты ополаскивают дистиллированной водой и высушивают на воздухе в вертикальном положении.

18. Люминесцентную микроскопию проводят в день окраски мазков под иммерсионной системой при увеличении $100\times$ с помощью микроскопа Nikon или аналогичным микроскопом другой марки, укомплектованным для проведения флуоресцентных исследований.

19. Учет и оценка результатов реакции.

В окрашенных препаратах мозговая ткань светится тусклым, серовато-желтым или зеленоватым цветом. Антиген вируса бешенства выявляется в нейронах и вне клеток в виде ярких желтовато-зеленых гранул различной формы и величины - от едва заметных до имеющих $15-20\text{ мкм}$ в диаметре. Иногда отмечается большое количество мелких ярких желто-зеленых частиц

(размером до 1 мкм) округлой и овальной формы. Учет результатов проводят по интенсивности свечения по четырехбальной системе в крестах:

- ++++ - яркое, сверкающее желто-зеленое свечение;
- +++ - отчетливо-выраженное достаточно яркое желто-зеленое свечение;
- ++ - неярко свечение желто-зеленого цвета;
- + - слабое свечение, обнаруживаемое в крупных включениях зелено-серого цвета;
- - отсутствие специфического свечения.

Пробу считают положительной, если в нескольких полях зрения микроскопа обнаруживают достаточное количество (не менее 10) типичных гранул с интенсивностью свечения 3-4 креста. В контрольных препаратах (в мазках или отпечатках из мозга здоровых не болевших бешенством белых мышей, окрашенных ФАГ и в исследуемых препаратах, окрашенных КФГ, а также в исследуемых препаратах, предварительно обработанных АнГ и окрашенных ФАГ) подобных образований не должно быть.

При отсутствии положительной флуоресценции ставят биопробу согласно существующему ГОСТу 26075-2013. Мозг от погибших мышей исследуют методом иммунофлуоресценции, или реакцией вируснейтрализации.

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

20. В подразделениях, где проводится работа с патологическим материалом от подозреваемых на заболевание бешенством, персонал должен быть вакцинирован против бешенства и обязан во время работы надевать спецодежду, резиновые перчатки (2 пары), двухслойную марлевую повязку или защитную маску, защитные очки и спецобувь. Одежду, материалы и посуду, содержащие вирус бешенства, автоклавируют в течение 1 ч при 1,5 атм.

21. Диагностический набор хранить в местах, недоступных для детей.

Инструкция разработана ФГБНУ «Федеральный центр токсикологической, радиационной и биологической безопасности», почтовый адрес: 420075, г.Казань, Научный городок – 2.

Организация-производитель ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»

С утверждением настоящей инструкции считать утратившей силу инструкцию, утвержденную Россельхознадзором от 04.03.2008 г.