

Заместитель Руководителя
Россельхознадзора



Е.А. Непоклонов

« 22 » сентября 2006 г.

Инструкция

по применению глобулина флуоресцирующего для диагностики бешенства животных (организация- производитель: 141142, ВНИТИБП; п.Биокомбинат, Щелковского р-она Московской обл.)

1. Общие сведения

1. Глобулин флуоресцирующий для диагностики бешенства предназначен для выявления антигена вируса бешенства в мазках-отпечатках из разных отделов головного мозга животных прямым методом флуоресцирующих антител.

2. Глобулин флуоресцирующий представляет собой глобулиновую фракцию, полученную из антирабической сыворотки овец, меченной флуоресцеинизотиоционатом (ФИТЦ). Для контроля специфичности метода используется глобулин флуоресцирующий контрольный и антирабическая сыворотка. Глобулин флуоресцирующий контрольный является глобулиновой фракцией, полученной из нормальной сыворотки овец, меченной флуоресцеинизотиоционатом.

3. Диагностикум расфасован в ампулы по 1 см³ и упакован в картонные коробки. Диагностикум состоит из следующих компонентов:

- глобулин флуоресцирующий 10 или 6 ампул, сухая пористая масса желто-оранжевого цвета;
- глобулин флуоресцирующий контрольный 5 или 2 ампулы, сухая пористая масса желто-оранжевого цвета;
- антирабическая сыворотка 5 или 2 ампулы, сухая пористая масса жел-

того цвета.

Диагностикум рассчитан на проведение исследования 800 или 480 образцов. Компоненты набора уложены в картонные коробки с разделительными перегородками, обеспечивающими неподвижность ампул. На этикетке ампулы должны быть указаны: наименование компонента, объем, номер серии, дата изготовления. На коробке должна быть этикетка с указанием предприятия-изготовителя и его товарного знака, наименования диагностикума, наименования компонентов диагностикума и их качества, номер серии и контроля, даты изготовления, срока годности, условий хранения, обозначения ТУ и надпись «для животных».

В каждую коробку вкладывают инструкцию по применению диагностикума.

4. Диагностикум хранят в сухом темном месте при температуре 2-8°C. Срок годности препаратов 12 мес. при соблюдении условий хранения. По истечении срока годности препарат не используют.

II. Принцип метода

5. Принцип метода флюоресцирующих антител основан на визуальном учете специфического взаимодействия флюоресцирующих антирабических антител с гомологичным рабическим антигеном. Образующийся при этом комплекс антиген-антитело, меченный флюорохромом, обнаруживается по характерному свечению в лучах люминесцентного микроскопа.

6. В контрольных препаратах и препаратах из мозговой ткани, содержащих вирус бешенства, обработанных последовательно антирабической сывороткой, а затем глобулином флюоресцирующим (реакция подавления иммунофлюоресценции) специфическое свечение должно быть подавлено или должно отсутствовать.

III. Порядок применения

7. Для растворения препаратов и промывки стекол после окрашивания применяют забуференный физиологический раствор (ЗБФР) pH 7,4±0,2, содержащий 2,8 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ или 0,2 г KH_2PO_4 и 8,0 г NaCl , в объеме 1 дм³.

8. При необходимости рН корректируют добавлением 0,1 М растворов КОН или HCl. Приготовленный ЗБФР рН $7,4 \pm 0,2$ стерилизуют и используют в работе в течение не более 2-х мес. при температуре хранения 2-6°C.

9. Препараты растворяют до первоначального объема, указанного на этикетке ампулы, стерильной дистиллированной водой, и используют в работе не более 2-х недель при температуре хранения 2-6°C. Для получения рабочего разведения препараты разводят ЗБФР рН $7,4 \pm 0,2$ и используют в день приготовления.

10. Новые предметные стекла выдерживают в смеси спирта-эфира (1:1) в течение 10 мин, протирают марлевым тампоном, не касаясь поверхности стекол пальцами, ополаскивают в 1-2 порциях свежей смеси спирта-эфира и высушивают на воздухе.

11. Использованные стекла кипятят 2 ч в растворе моющего средства (2 ст. ложки на 5 дм³ воды), многократно промывают дистиллированной водой и выдерживают в растворе спирто-эфирной смеси.

IV. Приготовление мазков и отпечатков

12. Для исследования методом иммунофлюоресценции берут кусочки свежего или свзамороженного патологического материала (мозговая ткань коры больших полушарий, аммонова рога, мозжечка, продолговатого мозга) и готовят мазки или отпечатки на обезжиренных предметных стеклах.

13. При поступлении в лабораторию материала, хранившегося в 50%-ном растворе глицерина, мозговую ткань промывают дистиллированной водой не менее чем пять раз. Образцы из несвежей мозговой ткани или с признаками разложения для исследования методом флюоресцирующих антител не пригодны.

14. Для приготовления мазков на предметное стекло помещают растертую ткань мозга, другим стеклом придавливают к первому и делают мазок, как при гематологических исследованиях.

15. Для получения отпечатков на предметное стекло помещают кусочки мозга поверхностью среза кверху и прикладывают обезжиренное предметное стекло, получая на нем отпечатки ткани.

Приготовленные мазки-отпечатки высушивают на воздухе и фиксиру-

ют охлажденным при 4°C ацетоном в морозильной камере ($-18\pm 2^{\circ}\text{C}$) в течение 2-4 ч. После фиксации мазки-отпечатки прополаскивают ЗБФР рН $7,4\pm 0,2$ и дистиллированной водой и высушивают на воздухе. Фиксированные мазки-отпечатки хранят в закрытом сосуде при $2-6^{\circ}\text{C}$ и используют в течение 3 дней.

16. В качестве контрольных мазков готовят мазки-отпечатки из ткани мозга от здоровых животных мышей.

V. Проведение исследования

17. Для анализа берут 6 мазков или отпечатков из исследуемых отделов мозга. На фиксированные 2 мазка наносят по 4 капли глобулина флюоресцирующего в рабочем разведении и распределяют его по всему препарату покачиванием стекла. Одновременно на другие 2 мазка наносят по 4 капли глобулина флюоресцирующего контрольного в рабочем разведении. Затем предметные стекла помещают во влажную камеру (чашки Петри с фильтровальной бумагой, увлажненной дистиллированной водой) и выдерживают в термостате при $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин.

18. Параллельно окрашивают контрольные мазки глобулином флюоресцирующим и глобулином флюоресцирующим контрольным.

19. Для контроля специфичности метода применяют реакцию подавления иммунофлюоресценции (блокировочный тест). Для этого на 2 мазка или отпечатка наносят антирабическую сыворотку в рабочем разведении и выдерживают в термостате при $(37\pm 1)^{\circ}\text{C}$ в течение 30 мин., промывают в 3-х сменах ЗБФР рН $7,4\pm 0,2$ и окрашивают глобулином флюоресцирующим в рабочем разведении.

20. После окончания окрашивания мазки промывают двукратно ЗБФР рН $7,4\pm 0,2$ по 10 мин., ополаскивают водой и высушивают на воздухе в вертикальном положении.

21. Люминесцентную микроскопию проводят в день окраски мазков под иммерсионной системой при увеличении 7×90 , используя кювету с дистиллированной водой в сочетании со светофильтрами: СЗС-14 (СЗС-7), ВС-2, ФС-1 (ФС-2), окулярные светофильтры: для МЛ-1 - Т-ТН (Т-2Н) или 1С-18 (ЛВС-19), для МЛ-2 - N1 или N2. Сила тока 4,1 А.

VI. Учет реакции

22. Положительным результатом исследования методом иммунофлюоресценции считается наличие специфической флюоресценции, которая характеризуется тем, что в препаратах окрашенных глобулином флюоресцирующим на темном серо-зелено-желтом фоне ткани, вирусные антигены выявляются в виде светящихся желто-зеленых структур, варьирующих по величине от мельчайших частиц до частиц, сравнимых по величине с тельцами Негри (0,24-27 мкм). Реакцию оценивают по интенсивности специфического свечения в крестах:

- +++ - четко видимое желто-зеленое свечение;
 - ++ - умеренное желто-зеленое свечение;
 - +
 -
- слабое желто-зеленое свечение ("тени");
- свечение отсутствует.

VII. Оценка результатов

23. Диагноз считается установленным, если в исследуемом препарате обнаруживают флюоресцирующие структуры желто-зеленого цвета с интенсивностью свечения не менее чем в два креста, варьирующие по величине от мельчайших частиц в виде точек до частиц, сравнимых по величине с тельцами Негри.

24. В контрольных мазках и мазках-отпечатках, содержащих вирус бешенства, обработанных глобулином флюоресцирующим контрольным, специфического свечения быть не должно. В препаратах из мозговой ткани, содержащих вирус бешенства, обработанных последовательно антирабической сывороткой, а затем глобулином флюоресцирующим в рабочем разведении (реакция подавления иммунофлюоресценции) специфическое свечение должно быть подавлено.

25. При получении отрицательного результата исследование необходимо повторить на таком же количестве мазков-отпечатков. При получении повторного отрицательного результата исследование продолжают в соответствии с "Методическими указаниями по лабораторной диагностике бе-

шенства".

VIII. Меры личной профилактики

26. Все работы с материалом, содержащим вирус бешенства, проводят в соответствии с общими требованиями безопасности. К работе допускаются лица, освоившие правила работы с вирусом бешенства. Всю работу с вирусом бешенства проводят в боксах. Для работы в боксах все работники одевают спецодежду – предварительно простерилизованные автоклавированием халаты, колпачки и маски и обувь, обработанную 20% -ным раствором формалина. По окончании работы боксы и предбоксы обрабатывают 3%-ным раствором перекиси водорода, 2%-ным раствором хлорамина или другими дезсредствами. Флаконы, ампулы и инструменты, а также оставшиеся материалы, содержащие вирус бешенства, и посуду после работы обеззараживают автоклавированием в течение 1 ч при 1,5 атм. Средства индивидуальной защиты, халаты, колпачки, косынки обеззараживают кипячением или автоклавированием. Рабочую поверхность стола и руки обеззараживают дезраствором (0,5% раствор хлорамина).

Диагностикум хранят в местах, не доступных для детей.

По истечении срока годности препарат не используют.

Инструкция разработана во Всероссийском научно-исследовательском институте биологической промышленности (141142, п. Биокомбинат, Щелковского района Московской области).

Рекомендовано ФГУ ВГНКИ к регистрации в Российской Федерации.
Регистрационный номер ПВР -1-2.9/00080