

УТВЕРЖДАЮ

Директор ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»

А. И. Никитин

« 5 » _____ 2016г



ИНСТРУКЦИЯ

по применению Набора препаратов для лабораторной диагностики бешенства животных методом иммуноферментного анализа (ИФА)

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

I. ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1. Набор препаратов для лабораторной диагностики бешенства животных методом иммуноферментного анализа (ИФА).

2. В состав набора входят:

- антирабический глобулин, 0,1 см³ - 2 ампулы;
- антирабический пероксидазный конъюгат, 0,1 см³ - 2 ампулы;
- контрольный положительный антиген, 0,1 см³ - 2 ампулы;
- контрольный отрицательный антиген, 0,1 см³ - 2 ампулы;
- фосфатно-буферный раствор с твином (ФБР-Т), 10-кратный концентрат, 100 см³ - 2 флакона;
- карбонатно-бикарбонатный буфер (КББ), 10 см³ - 2 флакона;
- фосфатно-цитратный буфер (ФЦБ), 10 см³ - 2 флакона;
- орто-фенилендиамин (ОФД), 4 мг - 2 флакона;
- планшет 96-луночный полистироловый для ИФА – 2 шт.

3. По внешнему виду антирабический глобулин, антирабический пероксидазный конъюгат, контрольные положительный и отрицательный антигены – гомогенная аморфная масса от белого до серого или светло-

желтого цвета; растворы - жидкость; орто-фенилендиамин (ОФД) – светло-желтый кристаллический порошок.

4. На ампуле и флаконе с каждым компонентом набора должна быть этикетка с указанием наименования организации-производителя, наименования препарата, количества его в ампуле (флаконе), номера серии, номера контроля, рабочего разведения, срока годности.

Компоненты набора уложены в картонные коробки с разделительными перегородками по ГОСТ 12301-81. На этикетке коробки должно быть указано: наименование и товарный знак организации-производителя, полное наименование набора, перечень компонентов набора, количества каждого препарата, входящих в набор, их рабочее разведение, номер серии, номер контроля, дата изготовления (месяц, год), срок годности, условия хранения, обозначение ТУ. В коробку вкладывают инструкцию по применению набора.

5. Срок годности диагностического набора 24 мес. с даты изготовления. Датой изготовления набора считают наиболее раннюю дату изготовления одного из компонентов, входящих в состав набора.

Наборы препаратов хранят в организации-производителе и у потребителя в сухих, темных помещениях при температуре от 2 до 10⁰С в пределах срока годности.

При изменении цвета препаратов, консистенции, при плохой растворимости применение их прекращают. Ампулы и флаконы с препаратами, содержащими посторонние примеси, с нарушением целостности, а также с истекшим сроком годности бракуют. Бракованные препараты подлежат утилизации автоклавированием при 1,0-1,5 атм. в течение 1ч.

6. Набор рассчитан на проведение одновременного анализа на двух планшетах в трех разведениях – 4-х контрольных и 60 исследуемых проб патологического материала.

II. ПРИНЦИП МЕТОДА

7. Набор препаратов для лабораторной диагностики бешенства животных методом иммуноферментного анализа (ИФА) предназначен для обнаружения антигена вируса бешенства в патологическом материале.

8. В основе метода ИФА лежит специфическое взаимодействие антигена с антителом, иммобилизованным на твердом носителе. Связанный антиген выявляется с помощью второго меченого ферментом антитела. Уровень меченых антител в этой реакции прямо пропорционален количеству антигена.

III. ПОРЯДОК ПРИМЕНЕНИЯ

9. Взятие и подготовка биологического материала для исследования

9.1 . В качестве исследуемого материала (антиген) используют пробы ткани из различных участков свежего или свежезамороженного головного мозга павших, вынужденно убитых, подозреваемых в заболевании бешенством или экспериментально зараженных вирусом бешенства животных. От крупных животных (лошадей, крупного рогатого скота, собак, лисиц и др.) исследуют аммионовы рога, мозжечок, кору больших полушариев, продолговатый мозг. У мелких животных иммуноферментный анализ проводят с какими-либо тремя отделами мозга. Этим методом допускается исследование несвежего патологического материала, контаминированного бактериальной микрофлорой и консервированного глицерином.

Приготовление исследуемого антигена

Пробу ткани головного мозга измельчают, растирают в ступке и готовят суспензию (1:10) на физиологическом растворе NaCl, pH 7,4 и прогревают в водяной бане при температуре 60°C в течение 15 мин. Суспензию мозга центрифугируют при 2 тыс.об./мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость используют в иммуноферментном анализе в качестве исследуемого антигена.

10. Подготовка реагентов

Все растворы и реагенты перед постановкой реакции необходимо выдержать не менее 30 мин при 22°C.

Содержимое флакона с надписью ФБР-Т разводят дистиллированной водой до 1000 см³. Полученный раствор используют для промывки планшет, разведения конъюгата и контрольных (положительного и отрицательного) антигенов.

Содержимое флакона с надписью КББ используют для разведения антирабического глобулина.

Субстратная смесь. Готовят непосредственно перед использованием. При проведении ИФА содержимое флакона с ОФД растворяют в 10 см³ (ФЦБ) в защищенном от света месте и вносят 0,14 см³ 3%-ного раствора перекиси водорода.

11. Проведение иммуноферментного анализа

Иммуноферментный анализ (ИФА) проводят в сэндвич-варианте с использованием компонентов, входящих в набор для выявления антигена возбудителя бешенства в патологическом материале (п.3). Перед проведением ИФА компоненты набора растворяют в 0,1 см³

дистиллированной воды и доводят до объема рабочих разведений, указанных на этикетке.

Объем ингредиентов, вносимых поэтапно в лунки планшета, равен между собой и составляет $0,1 \text{ см}^3$.

Сенсибилизация планшета.

В лунки полистиролового планшета вносят антирабический глобулин в рабочем разведении, указанном на этикетке. Разведение готовят на КББ. Планшет с антирабическим глобулином инкубируют в термостате при температуре $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$ в течение 3 ч., или 4°C в течение 18 ч. По окончании инкубации производят отмывку планшета раствором ФБР-Т 3 раза, предварительно встряхнув содержимое лунок. Остатки раствора удаляют постукиванием о фильтровальную бумагу.

Внесение антигенов.

В лунки планшета (1А и 2А соответственно и титруют по вертикали) вносят контрольные положительный и отрицательный антигены, а также исследуемую пробу в разведении от 1:10 до 1:40. Антигены раститровывают двукратно на ФБР-Т и инкубируют в термостате при $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$ в течение 1 ч. По истечении срока инкубации производят 3-х кратную отмывку лунок планшета от не связавшихся с иммуноглобулином антигенов и подсушивают на фильтровальной бумаге.

Внесение антирабического пероксидазного конъюгата.

В готовый к применению планшет вносят антирабический пероксидазный конъюгат в рабочем разведении. Реагирующую смесь выдерживают в термостате при $37 \pm 0,5^\circ \text{C}$ в течение 1 ч. Затем лунки планшета 3-хкратно отмывают и подсушивают.

Внесение субстратной смеси.

Для проявления реакции в лунки планшета вносят специфическую субстратную смесь фермента. Реакцию проявляют в течение 15-30 мин при $22 \pm 0,5^\circ \text{C}$ в темноте. Реакцию останавливают добавлением 2М раствора серной кислоты.

12. Учет иммуноферментного анализа производят визуально по разнице интенсивности продукта реакции опыта и контроля, а также на сканирующем спектрофотометре "Titertek multiskan" фирмы "Flow laboratories" или на аналогичных приборах при длине волны 492 нм.

При визуальной оценке реакции учет производят по 4-х-крестовой системе:

- ++++ - интенсивное оранжевое окрашивание;
- +++ - оранжевое окрашивание;
- ++ - бледно-оранжевое окрашивание;
- +
- - окрашивание отсутствует.

Пробу считают положительной при оценке в три креста и более при отсутствии окраски в лунках с контрольным отрицательным антигеном и

окрашивании в три креста и более в лунках с контрольным положительным антигеном.

При спектрофотометрическом учете результата ИФА производят расчет коэффициента специфичности, который равен отношению оптической плотности (ОП) продукта реакции в лунках с контрольным положительным антигеном или исследуемым материалом (ОП₁) к оптической плотности субстратной смеси в лунках с контрольным отрицательным антигеном (ОП₂). Реакцию считают положительной, если коэффициент специфичности не ниже 2,1 и отрицательной, если ниже 2,1.

IV. МЕРЫ ЛИЧНОЙ ПРОФИЛАКТИКИ

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

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

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

Организация-производитель ФГБНУ «ФЦТРБ-ВНИВИ»

С утверждением настоящей инструкции считать утратившей силу инструкцию, утвержденную Россельхознадзором от 03.03.2008 г.