



Министерство сельского хозяйства Российской Федерации  
Федеральная служба по ветеринарному и фитосанитарному надзору  
(РОССЕЛЬХОЗНАДЗОР)  
Федеральное государственное бюджетное учреждение  
«Федеральный центр охраны здоровья животных»  
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

**Методические указания  
по обнаружению  
флуоресцентным методом  
антибиотиков тетрациклинового  
ряда в тканях зубов и костей  
животных для контроля  
поедаемости оральных  
антирабических вакцин**

МУ 36-16

# **МУ 36-16**

## **МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ**

**ПО ОБНАРУЖЕНИЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ  
АНТИБИОТИКОВ ТЕТРАЦИКЛИНОВОГО РЯДА  
В ТКАНЯХ ЗУБОВ И КОСТЕЙ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ КОНТРОЛЯ  
ПОЕДАЕМОСТИ ОРАЛЬНЫХ АНТИРАБИЧЕСКИХ ВАКЦИН**

**Владимир 2016**

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО ВETERИНАРНОМУ И ФИТОСАНИТАРНОМУ НАДЗОРУ  
ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧЕРЕЖДЕНИЕ  
«ФЕДЕРАЛЬНЫЙ ЦЕНТР ОХРАНЫ ЗДОРОВЬЯ ЖИВОТНЫХ»  
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

СОГЛАСОВАНО  
Директор ФГБУ «Федеральный  
центр охраны здоровья животных»  
(ФГБУ «ВНИИЗЖ»)

« 06 »  
Д.А. Лозовой  
2016 г.



УТВЕРЖДАЮ  
Заместитель Руководителя  
Федеральной службы по ветеринарному и  
фитосанитарному надзору

« 06 »  
Н.А. Власов  
2016 г.



**МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ**

ПО ОБНАРУЖЕНИЮ ФЛУОРЕСЦЕНТНЫМ МЕТОДОМ АНТИБИОТИКОВ  
ТЕТРАЦИКЛИНОВОГО РЯДА В ТКАНЯХ ЗУБОВ И КОСТЕЙ ЖИВОТНЫХ ДЛЯ  
КОНТРОЛЯ ПОЕДАЕМОСТИ ОРАЛЬНЫХ АНТИРАБИЧЕСКИХ ВАКЦИН

2

## Содержание

1.	Введение.....	3
2.	Область применения .....	3
3.	Принцип определения тетрациклина .....	3
4.	Оборудование, реактивы и защитная одежда.....	4
5.	Меры безопасности при отборе проб и проведении исследования.....	4
6.	Взятие и подготовка материала к исследованию .....	6
7.	Метод исследования .....	7
8.	Учет и интерпретация результатов.....	8
9.	Заключение .....	11
10.	Рекомендуемая литература.....	11

## **1. Введение**

В целях борьбы с бешенством среди диких животных в Российской Федерации применяют оральные антирабические вакцины, содержащие в качестве маркера антибиотика тетрациклинового ряда (далее «тетрациклин»), которые после попадания в организм животного накапливаются в местах роста костной ткани, в частности, ткани зубов. Данное свойство тетрациклина используют для оценки поедаемости вакцины животными в дикой природе.

## **2. Область применения**

Методические указания разработаны в ФГУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» и предназначены для использования в лабораторных и научных учреждениях ветеринарного и биологического профиля, проводящих мониторинг поедаемости оральных антирабических и других вакцин, предназначенных для диких плотоядных животных.

## **3. Принцип определения тетрациклина**

Вакцинная приманка для оральной иммунизации диких животных содержат 150-200 мг тетрациклина в качестве маркера. После поедания приманок тетрациклин накапливается в тканях костей и зубов животных.

Метод определения тетрациклина основан на флуоресценции скоплений тетрациклина в ткани костей или зубов, определяемых в отраженном свете флуоресцентного микроскопа. Тетрациклин имеет широкий спектр поглощения в ультрафиолетовой области с максимумами, в зависимости от заряда, около 270 и 375 нм, и широкий спектр высвечивания в видимой области, в интервале от 400 до 700 нм, с максимумами в синей, при 460 нм, и в желтой, при 580 нм, областях спектра. Фильтры микроскопа подбирают, исходя из этих свойств тетрациклина.

#### **4. Оборудование, реактивы и защитная одежда**

- Микроскоп флуоресцентный с набором фильтров для обнаружения тетрациклина.
- Прецизионная низкоскоростная пила или малогабаритный токарный станок с регулируемой скоростью и 2 фрезами с зазором между ними 0,5 – 1,0 мм (рис. 1).
- Набор анатомический большой.
- Холодильники, с рабочим диапазоном от 2°С до 8°С с морозильным отделением от минус 20°С до минус 12°С.
- Предметные стекла.
- 70% раствор этилового спирта.
- Синтетическое моющее средство (смс).
- Резиновые перчатки анатомические или хирургические, не стерильные.
- Средство защиты для лица от мелких частиц (щиток НБТ-1 или другое средство не хуже по характеристикам).
- Защитная маска.
- Халаты лабораторные.

#### **5. Меры безопасности при отборе проб и проведении исследования**

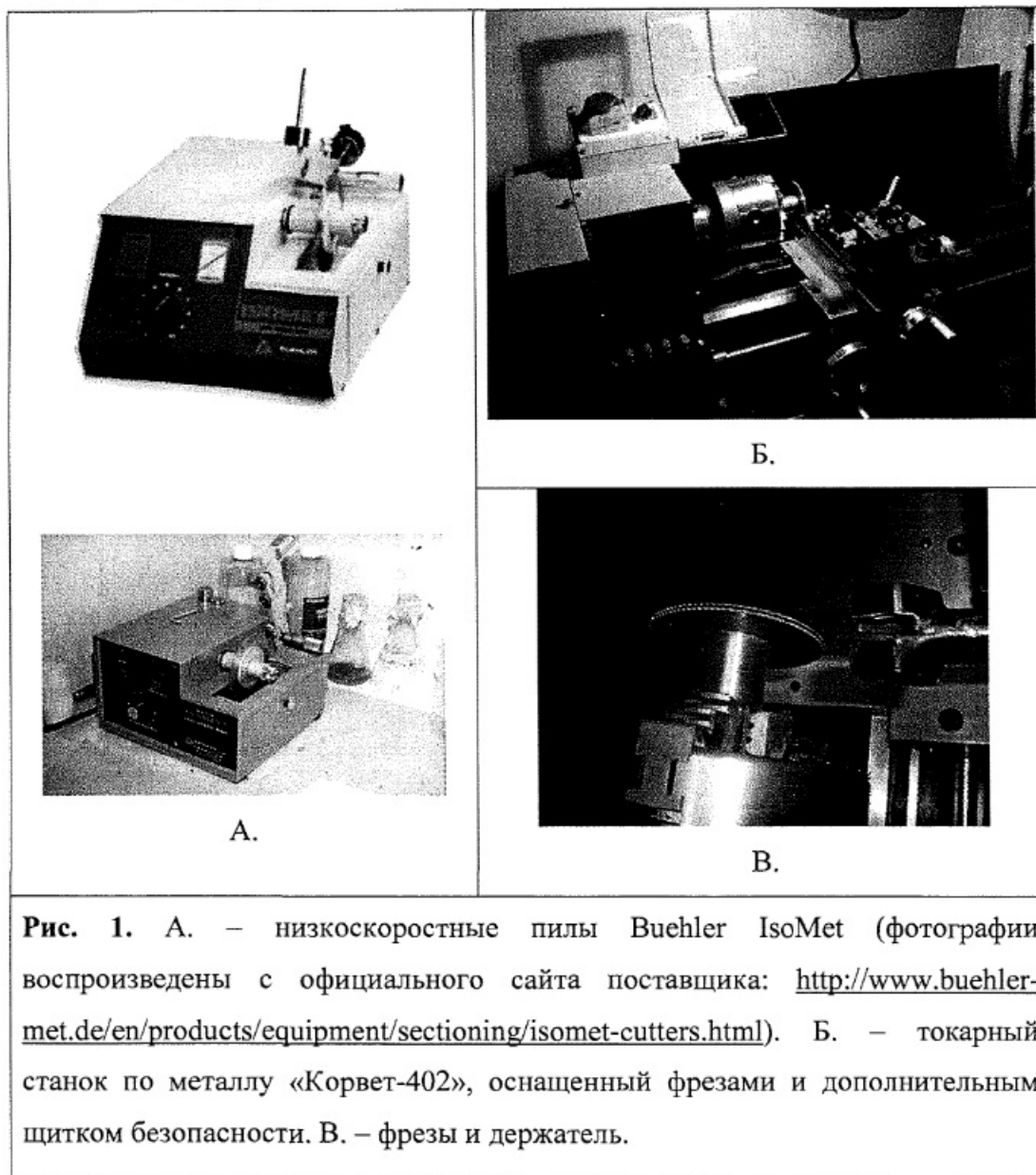
5.1. Работа с исследуемым материалом должна проводиться с соблюдением Санитарно-эпидемиологических правил СП 1.3.3118-13 «Безопасность работы с микроорганизмами I – II групп патогенности (опасности)», от 28.11.2013 г. Персонал, занятый в подготовке проб, получении срезов костной ткани и их исследовании должен быть вакцинирован против бешенства в установленном порядке.

5.2. Остатки патологического материала обеззараживают в соответствии с нормативными документами (СП 1.3.3118-13).

5

5.3. Весь инструмент, соприкасавшийся с патологическим материалом, подвергают обеззараживанию кипячением в дистиллированной воде в течение 30 минут.

5.4. По окончании исследования рабочую поверхность пилы и токарного станка протирают 70% раствором этилового спирта, помещение подвергают ультрафиолетовому облучению не менее 30 минут.



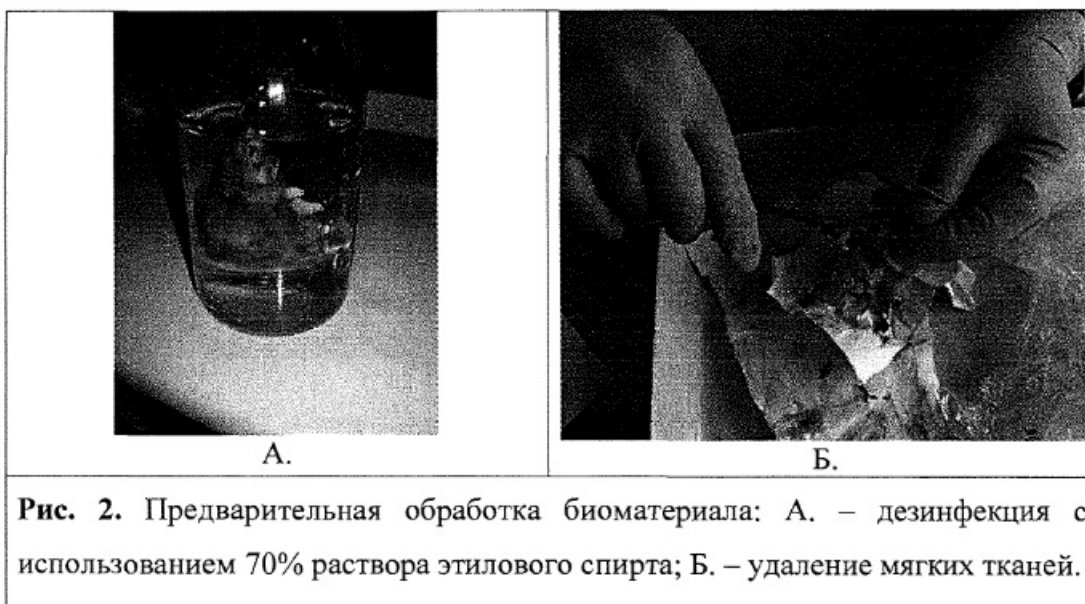
**Рис. 1.** А. – низкоскоростные пилы Buehler IsoMet (фотографии воспроизведены с официального сайта поставщика: <http://www.buehler-met.de/en/products/equipment/sectioning/isomet-cutters.html>). Б. – токарный станок по металлу «Корвет-402», оснащенный фрезами и дополнительным щитком безопасности. В. – фрезы и держатель.

## 6. Взятие и подготовка материала к исследованию

6.1. В качестве биологического материала для проведения исследования на выявление тетрациклина используют образцы зубов или нижнечелюстной кости животных. На анализ направляют одну из ветвей нижней челюсти с зубами.

6.2. Все образцы зубной и костной ткани перед распиливанием выдерживают 3-5 минут в 70% растворе этилового спирта с целью дезинфекции (рис. 2 А.).

6.3. С поверхности образца удаляют слизистые оболочки, мышечные и другие ткани (рис. 2 Б.).

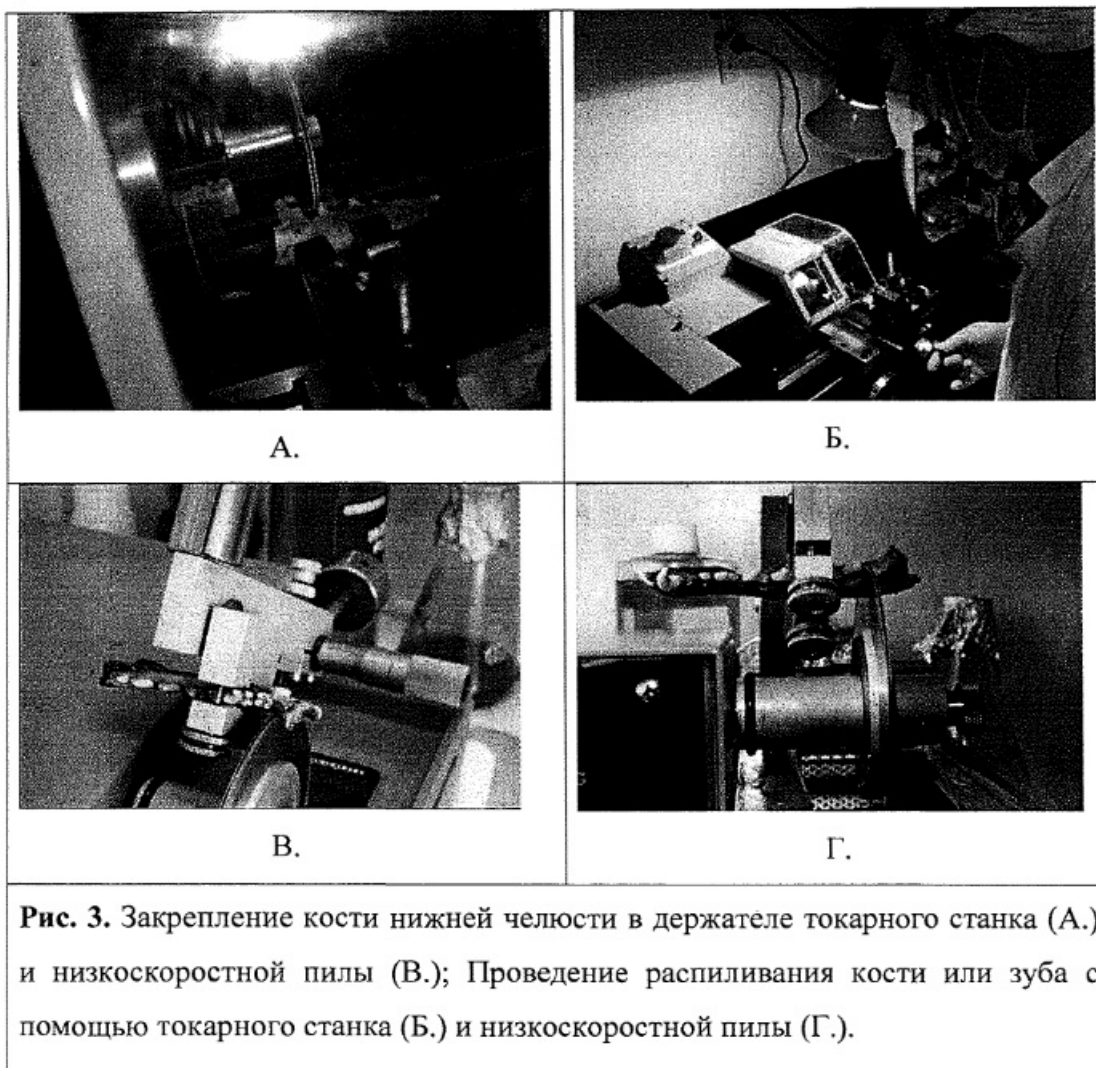


**Рис. 2.** Предварительная обработка биоматериала: А. – дезинфекция с использованием 70% раствора этилового спирта; Б. – удаление мягких тканей.



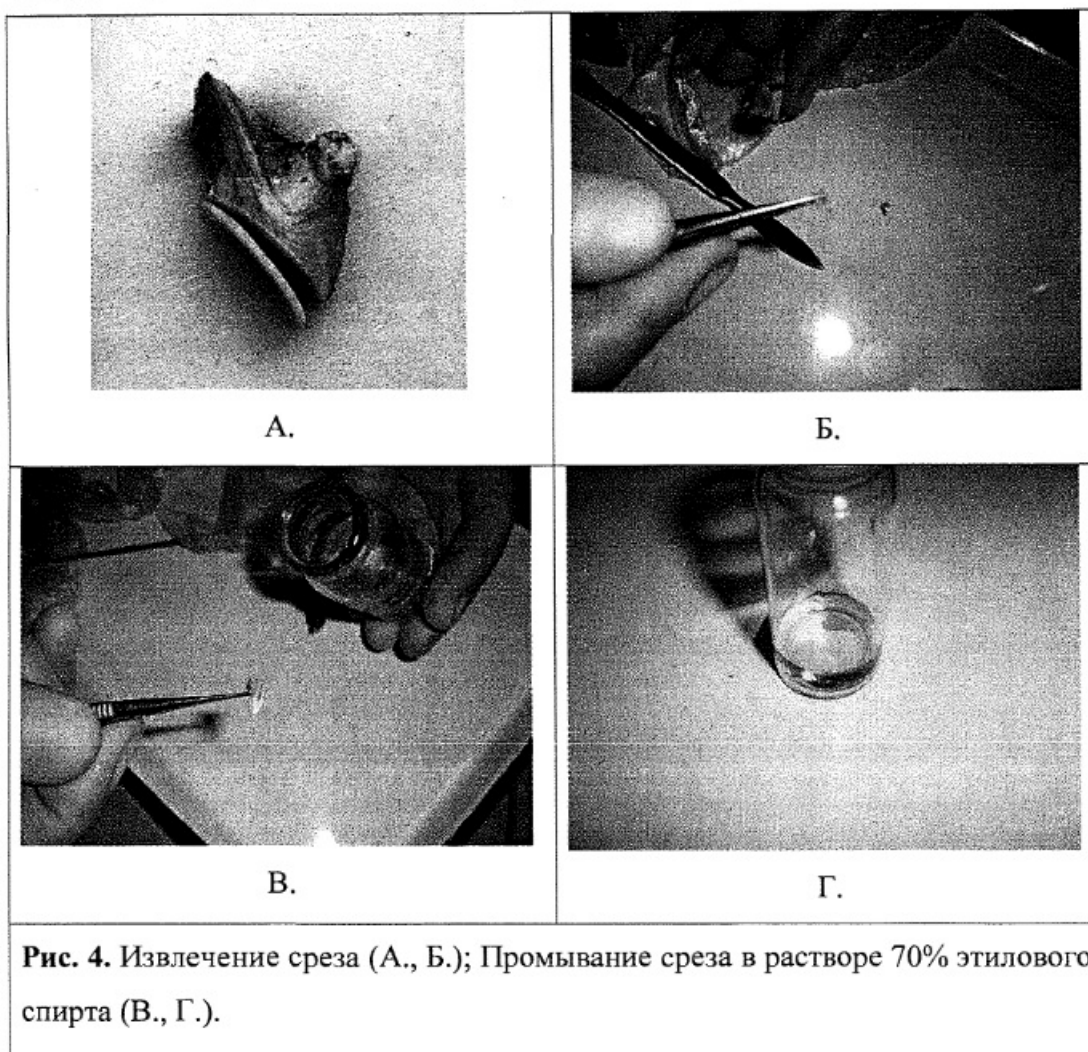
## 7. Метод исследования

7.1. Ветвь нижней челюсти закрепляют в держателе пилы или токарного станка и производят распиливание (рис. 3), на глубину около 3-7 мм, в зависимости от толщины зуба или кости, при этом зуб или кость распиливают не до конца (рис 4 А).



7.2. Полученные срезы отламывают с помощью пинцета, промывают в растворе 70 % этилового спирта в течение нескольких секунд (рис. 4) и хранят до завершения исследования при температуре от минус 20°С до минус 12°С,

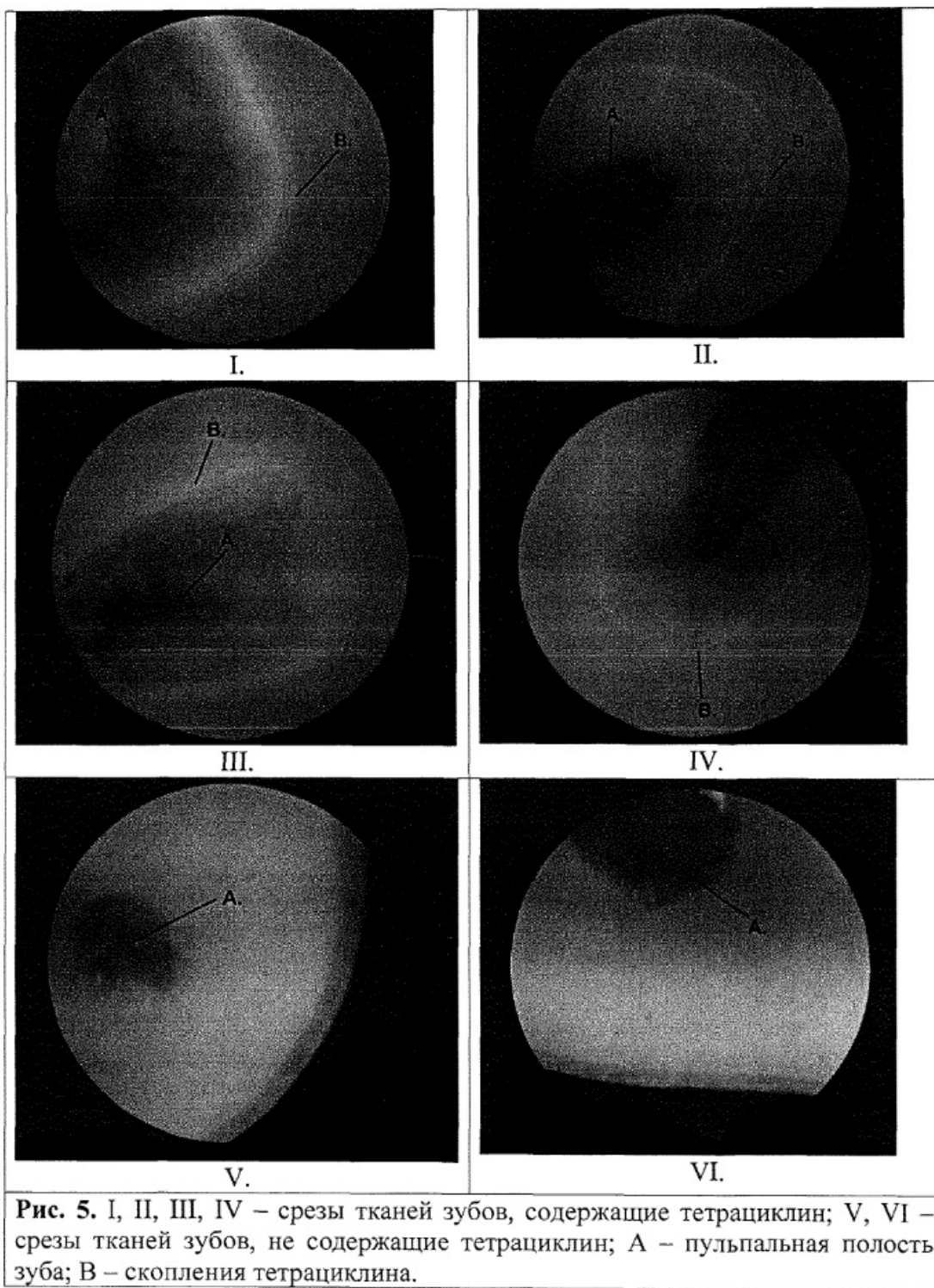
упакованными в пробирки или флаконы в морозильном отделе холодильника. Каждую пробирку снабжают индивидуальной маркировкой.

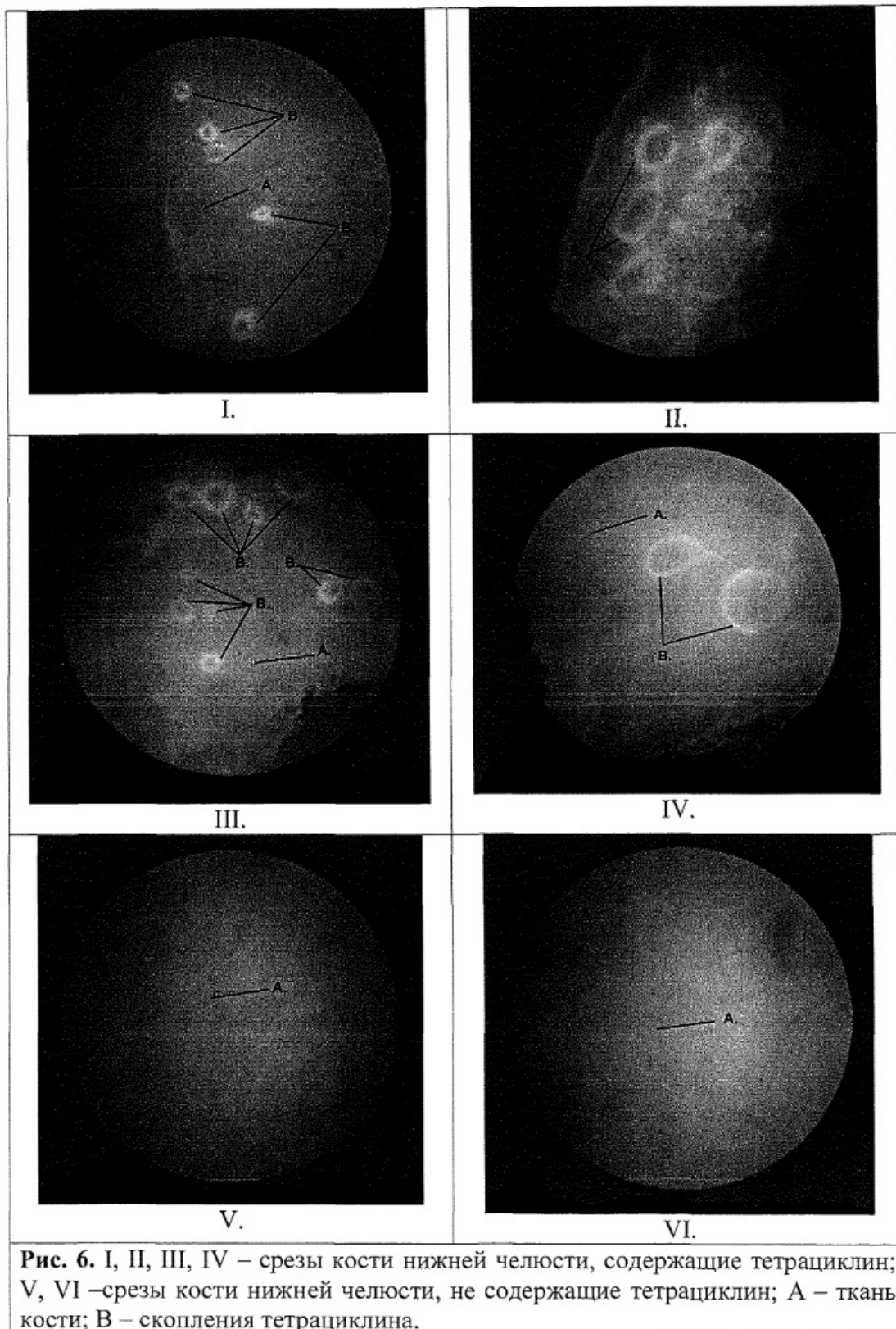


## 8. Учет и интерпретация результатов

8.1. Результаты обнаружения тетрациклина учитывают с помощью флуоресцентного микроскопа, оснащенного светофильтрами от 400 до 600 нм.

8.2. Исследуют образцы при увеличении  $\times 40-100$ . Присутствие в образце зуба или кости в поле зрения микроскопа тонких колец, полуколец, дуг желтого цвета (рис. 5 и 6) указывает на наличие включений тетрациклина. Обнаружение нескольких колец (рис. 5-1) может свидетельствовать о неоднократном поедании животным субстанции, содержащих тетрациклин.





**Рис. 6.** I, II, III, IV – срезы кости нижней челюсти, содержащие тетрациклин; V, VI – срезы кости нижней челюсти, не содержащие тетрациклин; А – ткань кости; В – скопления тетрациклина.

## 9. Заключение

Методические указания по обнаружению флуоресцентным методом антибиотиков тетрациклинового ряда в образцах зубов и костей животных прошли межведомственные комиссионные испытания в установленном порядке и рекомендуются к применению для оценки поедаемости оральных антирабических и других вакцин, содержащих в своем составе в качестве маркера тетрациклин.

## 10. Рекомендуемая литература

1. Fry T.L., Dunbar M.R. A review of biomarkers used for wildlife damage and disease management. Proceedings of the 12th Wildlife Damage Management Conference (D.L. Nolte, W.M. Arjo, D.H. Stalman, Eds). 2007.
2. Rosatte R.C., Lawson K.F. Acceptance of baits for delivery of oral rabies vaccine to raccoons. Journal of Wildlife Diseases, 37(4), 2001, pp. 730–739.
3. Johnston J.J., Primus T. M., Buettgenbach T. Evaluation and significance of tetracycline stability rabies vaccine baits. Journal of Wildlife Diseases, 41(3), 2005, pp. 549–558.

---

*Методические указания разработаны ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») в виде «Методических рекомендаций по обнаружению флуоресцентным методом антибиотиков тетрациклинового ряда в тканях зубов и костей животных для контроля поедаемости оральных антирабических вакцин» № 36-16, утвержденных Ученым советом ФГБУ «Федеральный центр охраны здоровья животных» (ФГБУ «ВНИИЗЖ») «31» мая 2016. г.*

*Настоящие методические указания вступают в действие с момента утверждения Федеральной службой по ветеринарному и фитосанитарному надзору.*