

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть

6 июня 2008 г.

Регистрационный № 035-0408

**СБОР, ДОСТАВКА, ХРАНЕНИЕ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ
ИНФЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ЛАБОРАТОРНОЙ
ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ БЕШЕНСТВА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: ГУ «Научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии»

АВТОРЫ: д-р биол. наук Н.П. Мишаева, В.Е. Дубиковский, В.В. Щерба, Н.Г.
Минина

Минск 2008

В Республике Беларусь прижизненная лабораторная диагностика бешенства не проводится, в результате диагноз больным выставляется обычно на поздних стадиях заболевания или посмертно на основании клинических и эпидемиологических данных и исследования головного мозга погибших от гидрофобии лиц. Однако при атипичном течении заболевания (без гидро- и аэрофобии) бешенство у больных протекает под другими диагнозами, что не позволяет не только своевременно проводить адекватное лечение больных, но и вовремя организовывать противоэпидемические мероприятия. Лабораторная экспресс-диагностика актуальна и для ветеринарной медицины, так как десятки тысяч людей ежегодно подвергаются укусам подозрительных на бешенство животных, и перед врачами, оказывающими антирабическую помощь, встает дилемма: назначать или не назначать курс антирабических прививок.

Настоящая инструкция предназначена для сбора, доставки и хранения биологического материала, пригодного для прижизненной экспресс-диагностики бешенства у неврологических больных, подозрительных на бешенство, и у домашних животных, покусавших людей, при решении вопроса о назначении пострадавшим курса иммунизации антирабической вакциной и иммуноглобулином. Может быть использована медицинскими и ветеринарными работниками при обследовании больных людей и животных при подозрении на заболевание их бешенством.

Материалом для прижизненной диагностики бешенства могут служить слюна больного человека или животного, слезная жидкость, буккальный эпителий, отпечатки роговицы глаза, биоптаты заднего отдела шеи, содержащие луковицы волос, а также сыворотка крови и ликвор больных.

Прижизненная экспресс-диагностика бешенства необходима для раннего выявления больных с атипичным течением бешенства с целью своевременного адекватного специфического лечения, а также для профилактики бешенства у лиц, покусанных неизвестными животными, подозрительными на бешенство.

Экспресс-диагностика бешенства крайне важна для исключения бешенства у доноров, органы которых предназначены для трансплантации.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Люминесцентный микроскоп.

Холодильник бытовой двухкамерный. В холодильной камере температура должна быть на уровне 4–6°C, в морозильной камере — 18±2°C ниже нуля.

Биопсийные щипцы.

Стандартные предметные стекла СП-3 для приготовления отпечатков тканей, обезжиренные в смеси «спирт – эфир».

Узкие предметные стекла, обезжиренные и стерильные для взятия отпечатков роговицы глаза.

8-луночные предметные стекла.
Пенициллиновые флаконы.
Эпепдорфы – 1,5 мл.
Пипетки П1-1,0; П1-10,0 мл ТУ 64-339-81 или аналогичные.
Пинцет анатомический.
Пинцет глазной.
Резиновые перчатки.
Маски медицинские.
Вода дистиллированная ГОСТ 6709-72.
Эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота.
Диагностический антирабический флюоресцирующий иммуноглобулин.
Иммуноглобулин флюоресцирующий контрольный.
Ацетон х/ч для фиксации отпечатков.
Забуференный стерильный физиологический раствор (ФСБ) рН = 7.
Эфир.
Этиловый спирт.
Краска Эванса.
Иммерсионное масло.
Местноанестезирующий препарат (лидокаин или дикаин).
Дезраствор (хлорамин – 0,5%; перекись водорода – 3%).
DABCO (1,4-diazabicyclo[2.2.2]octane).
Полихлорвиниловый спирт.
Tris-HCl – Sigma.

СБОР, ДОСТАВКА И ХРАНЕНИЕ ИНФЕКЦИОННОГО МАТЕРИАЛА ДЛЯ ПРИЖИЗНЕННОЙ ДИАГНОСТИКИ БЕШЕНСТВА

1. Материал для прижизненной диагностики

В качестве материала для прижизненной диагностики бешенства можно использовать выделения и биологические жидкости, а также ткани больных людей и животных, в т. ч.:

1.1. Для выявления антигена:

- отпечатки роговицы глаза больного человека или животного;
- буккальный эпителий;
- луковицы волос;
- биоптаты тканей.

1.2. Для выявления РНК вируса:

- биоптаты тканей;
- слезную жидкость;
- слюну;
- спинномозговую жидкость (СМЖ).

1.3. Для выделения вируса:

- слюну больного человека или животного;
- слезную жидкость;

- СМЖ на ранних стадиях заболевания.

1.4. Для выявления антител:

- СМЖ на поздних стадиях заболевания;
- сыворотку крови.

2. Сбор и хранение инфекционного материала

2.1. Слезная жидкость. Забор осуществляют в одноразовые стерильные пробирки объемом 1,5 мл. Для усиления слезоотделения проводится провокация слезоточивым веществом (обычно используется нашатырный спирт). Предобработка проб не требуется.

Условия хранения материала до момента исследования:

- при температуре +2–8°C — в течение 6 ч;
- при температуре –20°C — в течение 1 недели;
- при температуре минус 70°C — длительно.

Допускается однократное замораживание-оттаивание материала.

2.2. Защечный (буккальный) эпителий. Защечный эпителий — это верхний слой живых клеток, которые очень удобны для исследования на бешенство. Клетки легко отделяются, достаточно крупные, с овальными ядрами, которые обычно занимают центральное положение. Если такие клетки перенести в пробирку с физиологическим раствором (с добавлением 5–10% эмбриональной сыворотки теленка), они долго остаются жизнеспособными, к тому же хорошо видны при увеличении в 400 и даже в 200 раз.

Забор буккального эпителия исключает прием пищи в течение 4-х часов. Перед забором производится тщательное полоскание полости рта водой или физиологическим раствором. Забор эпителия производится соскобом клеток с внутренней стороны щеки тупым стерильным шпателем, пластиковой кисточкой, разовым зондом с синтетическим ворсом. Соскоб со шпателя аккуратно смывается физиологическим раствором в стерильную одноразовую пробирку типа «Эппендорф» (0,5–3 мл) с транспортной средой (физиологический раствор). При использовании зонда с синтетическим ворсом в пробирку помещается отрезанная рабочая часть зонда. Забор буккального эпителия может производиться самостоятельно обследуемым, процедура совершенно безболезненна, бескровна и не травматична.

Материал в пробирки необходимо отбирать по возможности свежий, до доставки в лабораторию материал хранят при –20°C не более 7 дней, транспортировка осуществляется в термосе со льдом.

2.3. Роговичные отпечатки. Отпечатки роговицы глаза берут на тщательно обезжиренные в смеси спирт – эфир (1:1) стерильные предметные стекла шириной 10–12 мм, что обеспечивает хороший доступ к роговице.

Взятие отпечатков роговицы у человека должно производиться врачом, а у животных – ветеринаром или фельдшером с соблюдением мер личной безопасности (особенно при необычном поведении животного). Для этого в целях безопасности на руки надевают резиновые перчатки, лицо от защищают марлевой повязкой и очками или плексигласовым щитком. Собак

и кошек во избежание нанесения ими укусов или царапин надежно фиксируют, собаки должны быть в намордниках. Животных, которые ведут себя беспокойно, можно временно обездвигить (наркоз).

Отпечатки фиксируют охлажденным ацетоном, препараты высушивают на воздухе в течение 4-х ч при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ или путем 5–8-кратной проводки над пламенем горелки. Перед окраской отпечатков диагностическим антирабическим иммуноглобулином их контуры очерчивают карандашом по стеклу с обратной стороны.

Условия хранения: при комнатной температуре или в условиях холодильника ($+2-8^{\circ}\text{C}$) — в течение 6 часов.

2.4. Слюна. Взятие слюны осуществляется в одноразовые стерильные пробирки типа «Эппендорф» на 1,5 мл в количестве 0,2–1,0 мл. За 12 ч до сбора слюны исключают прием алкоголя. Непосредственно перед сбором необходимо исключить использование зубной пасты и удалить зубные протезы. Производится трехкратное полоскание полости рта физиологическим раствором и вновь образовавшаяся слюна отсасывается со дна ротовой полости одноразовым шприцем и переносится в одноразовые стерильные сухие флаконы или выплевывается в них. Предобработка проб не требуется. Транспортировку клинического материала осуществляют в специальном термоконтейнере с охлаждающими элементами или в термосе со льдом.

Условия хранения: при температуре $+2-8^{\circ}\text{C}$ — в течение 6 ч; в замороженном виде — до момента исследования. Не рекомендуется размораживание более одного раза.

2.5. Луковицы волос. При взятии проб волосы и поверхность кожи в зоне шеи обрабатывают спиртом, после чего проводится аккуратное выдергивание волос. Необходимо следить, чтобы на концах взятых волос оставались волосяные луковицы, потому что именно они используются для анализа. Необходимо выдернуть не менее 3–4 волос с луковицами.

Условия хранения: при комнатной температуре — в течение 6 ч; при температуре $2-8^{\circ}\text{C}$ — длительное время, но обязательно в сухом и темном месте. Свет разрушает цепочки ДНК, поэтому при отправке по почте конверты с образцами волос нужно упаковывать в плотную бумагу или пакет. Не следует использовать для взятия и хранения проб полиэтиленовые пакеты, в которых обычно скапливается влага, и могут поселиться бактерии и грибки.

2.6. Спинномозговая жидкость. Ликвор получают путем прокола поясничной субокципитальной области или мозговых желудочков одноразовыми пункционными иглами. Забор ликвора в количестве не менее 0,5–1 мл проводят в одноразовые пластиковые пробирки объемом 1,5 мл. Предобработка проб не требуется.

Условия хранения: при -20°C .

2.7. Кровь. Забор крови для ПЦР-диагностики. Использование цельной крови и плазмы допустимо для проведения качественных и количественных

исследований, использование сыворотки крови — только для проведения качественных исследований методом ПЦР.

Для получения плазмы забор крови производят натошак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8–1,1 мм) в одноразовый шприц объемом 5 мл или специальную вакуумную систему типа «Venoject» (с 6% ЭДТА).

При заборе в шприц кровь из него аккуратно (без образования пены) переносят в одноразовую пластиковую пробирку с антикоагулянтом (6% раствор ЭДТА в соотношении 1:20). Гепарин в качестве антикоагулянта использовать нельзя! Пробирку закрывают крышкой и аккуратно переворачивают несколько раз (для перемешивания с антикоагулянтом).

Для получения сыворотки забор крови проводят натошак из локтевой вены одноразовой иглой (диаметр 0,8–1,1 мм) в одноразовый шприц объемом 3–5 мл или специальную вакуумную систему типа «Venoject» без антикоагулянта. При заборе в шприц кровь из него аккуратно (без образования пены) переносят в одноразовую стеклянную пробирку.

Предобработка проб. Плазму крови получают центрифугированием пробирок с цельной кровью при 800–1600g (3 тыс. об./мин) в течение 20 мин при комнатной температуре. Затем отбирают плазму в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с аэрозольным барьером в стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

Для получения сыворотки пробирки с кровью отстаивают при комнатной температуре до полного образования сгустка. Затем центрифугируют при 3 тыс. об./мин в течение 10 мин при комнатной температуре. Переносят сыворотку в количестве не менее 1 мл отдельными наконечниками с аэрозольным барьером в стерильные пробирки объемом 1,5 мл.

Условия хранения: образцы цельной крови хранят при температуре 2–5°C. Пробы крови хранят и транспортируют при низких положительных температурах в течение 3-х суток с момента взятия. Сыворотки крови хранят в заморозке (–20°C).

2.8. Биоптаты (микробиоптаты). При инвазивных вмешательствах или при обработке глубоких и обширных укушенных ран для обнаружения рабического вируса или его антигена можно использовать биоптаты органов. Забор микробиоптата (пунктата) производит врач биопсийными щипцами, изымая от каждого органа или укушенной раны 1–2 кусочка ткани или поврежденной кожи размерами от 1 мм³ до 1 см³. Материал после взятия помещают в пробирки объемом 1,5 мл с транспортной средой, закрывают пробкой, маркируют и тщательно упаковывают.

Предобработка проб не требуется.

Образцы пунктатов, предназначенные для выделения РНК, хранят при температуре 2–8°C. При отправке материала в вирусологическую лабораторию принимают меры предосторожности, чтобы не разбить стеклянную посуду. Кусочки необходимо в течение первых суток после изъятия передать в лабораторию. Если такой возможности нет, их сохраняют

в холодильнике не более 36 ч до передачи в лабораторию. Максимальный срок хранения — 14 дней при +4°C.

2.9. Сроки забора материала. При любом выбранном подходе к ранней диагностике бешенства одним из важнейших факторов является качество исследуемого материала. Так, например, для прямого анализа образца или для изоляции вируса исследуемый материал должен быть получен в самом начале заболевания, когда возбудитель еще экскретируется в относительно больших количествах и не связан пока антителами, а объем образца должен быть достаточен для проведения прямого исследования. При исследовании биоптата заднего отдела шеи нужно следить, чтобы в образце содержались неповрежденные луковицы волос (волосы не должны быть сострижены), при этом минимальное количество волос должно быть не менее 3. Следует учитывать, что локальное повышение температуры в клетках луковицы приводит к их разрушению.

Не последнюю роль в успешной диагностике играет среда, в которую берется материал, как он транспортируется и хранится. Так, если планируется изоляция вируса, инфекционный материал должен быть помещен в среду, содержащую белок, который предотвращает быструю потерю инфекционности вируса. Если планируется работа с нуклеиновыми кислотами, материал следует помещать в соответствующий буфер. Обычно исследуемый материал помещают в стерильную посуду со стабилизирующей средой, которая состоит из буферного раствора с нейтральным pH, белка и антибиотиков, и по возможности быстро доставляют в вирусологическую лабораторию в контейнере со льдом.

В лаборатории забранный для исследования материал надо сохранять в холодильнике или на льду вплоть до исследования. Однократное замораживание не влияет на результаты исследования, в то время как многократное замораживание и оттаивание снижают диагностическую ценность материала.

ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКА БЕШЕНСТВА

Методы выявления антигенов. При бешенстве для экспресс-диагностики можно использовать методы флуоресцирующих антител (МФА), реакции преципитации (РП) в агаровом геле, методы иммуноферментного анализа (ИФА), полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для прижизненной диагностики бешенства у человека требуется несколько тестов.

Определение антител к антигенам вируса бешенства. Выявление антител в сыворотке крови или в цереброспинальной жидкости — важный метод диагностики. Серологическое исследование рабиес-специфических антител проводится в сыворотке крови для определения пред- и постэкспозиционной вакцинации и определения времени бустерной иммунизации с целью повышения иммунного ответа.

Выделение вируса. Для выделения и идентификации вируса используют метод биопробы на белых мышах. Исследуемый материал суспендируют в физиологическом растворе, содержащем антибиотики и

эмбриональную сыворотку крупного рогатого скота. Суспензия вводится интрацеребрально белым мышам массой 5–6 г. Для доказательства развития инфекции за мышами ежедневно наблюдают до 30-го дня после инокуляции. Мыши, у которых за этот период развивается заболевание, немедленно подвергаются эвтаназии, и ткани мозга исследуются методом прямой МФА.

Преимущество данного подхода состоит в возможности определить малые количества вируса бешенства в материале. Недостаток метода — необходимость многодневного (7–18 суток) ожидания между инокуляцией и проявлением первых признаков заболевания. Для сокращения инкубационного периода применяют мышей-сосунков. Для экспресс-диагностики можно использовать мышей в возрасте менее 3 дней: у мышей, забитых через 3 дня, уже выявляется антиген вируса в мозге, который можно выявить методом МФА.

Такой метод выделения вируса практикуется в качестве подтверждающего диагностического теста при отрицательных результатах по выявлению антигена и телец Бабеша – Негри и в случае укуса человека подозрительным на бешенство животным. Он обеспечивает надлежащую чувствительность и специфичность, т. е. расценивается на уровне диагностической значимости метода прямой иммунофлуоресценции. Кроме того, этот метод является основным для идентификации вариантов вируса и перспективен для разработки диагностических реагентов.

Выделение и идентификация вируса на культуре клеток. Основным недостатком выделения вируса при инфицировании лабораторных животных является длительность метода. Избежать этого можно при использовании культур клеток. Обычно для этих целей используют культуру клеток нейробластомы мышей, если нужно исследовать ткани головного мозга. Мозг суспендируют в культуральной питательной среде, суспензию наносят на монослой культуры клеток и инкубируют от одного до нескольких дней.

Чувствительность данной культуры к вирусу можно повысить обработкой ее ДЕАЕ декстраном. Монослой клеток затем отмывают, фиксируют на холоде ацетоном или смесью формалина с метанолом и исследуют методом иммунофлуоресценции. Если животное было инфицировано вирусом бешенства, то в монослое культуры клеток выявляются цитоплазматические включения антигена вируса бешенства.

Показано, что на клетках мышинной нейробластомы линии Na C1 300 в сочетании с МФА антиген вируса бешенства можно выявить через 2 дня. Чувствительность метода сравнима с методом изоляции вируса на мышах.

Хотя вирус бешенства обладает облигатной нейрпатогенностью *in vivo*, он способен инфицировать широкий круг клеток-хозяев *in vitro*, что можно использовать для исследования других тканей и органов на наличие вируса бешенства. Установлено, что вирус бешенства размножается в клетках ВНК-21 и Vero, в первичных клетках куриных эмбрионов или почек хомяка. Показано, что адсорбция вируса и внедрение его в клетку происходят в течение 7 ч. Через 24–48 ч внутри клетки образуются новые вирусные

частицы, через 72 ч происходит почкование их из клеточной оболочки в межклеточное пространство.

Методы исследования

Для экспресс-диагностики бешенства могут быть использованы:

а) метод **МФА** — для выявления антигена вируса бешенства в отпечатках роговицы или заднего отдела шеи больного, содержащего луковицы волос;

б) метод **ПЦР** — для выявления РНК вируса в биоптатах тканей, слюне, спинномозговой или слезной жидкости;

в) метод **ИФА** — для выявления специфических антител (антигена) у больных с типичным или атипичным течением.

г) метод **биопробы** — для выделения вируса на ранних этапах заболевания или для выявления антител в крови или спинномозговой жидкости на поздних стадиях заболевания. Для экспресс-диагностики используется комплексный метод (биопроба + МФА), заключающийся в заражении исследуемым материалом 2-дневных новорожденных мышей и исследования их мозга на 3–4-е сутки в МФА.

Выбор методов прижизненной диагностики в значительной мере зависит от стадии болезни: метод, основанный на выявлении антигенов, как правило, обладает высокой чувствительностью в конце инкубационного периода, в течение первых нескольких дней заболевания, в то время как вируснейтрализующие антитела обычно появляются в спинномозговой жидкости и сыворотке крови после 7-10 дней от начала болезни.

Реакция иммунофлюоресценции. Метод основан на использовании антител, связанных с красителем, например, флюоресцеинизотиоцианатом. РИФ широко применяется для выявления вирусных антигенов в материале больных и для быстрой диагностики.

Метод обладает наиболее высокой степенью чувствительности, он положен в основу экспресс-диагностики и позволяет обнаруживать вирусные антигены в течение нескольких часов

Основные достоинства МФА: быстрота выполнения, высокая специфичность (100%). Затрачиваемое время на диагностику заболевания с его помощью — менее одного дня. Применяются прямой и непрямой варианты МФА.

Прямая иммунофлюоресценция остается наиболее предпочитаемым методом диагностики бешенства. Предметные стекла, содержащие мазки-отпечатки тканей мозга, или стекла с монослоем культуры тканей фиксируют в ацетоне в течение 1–4 ч. Затем препараты высушивают и обрабатывают флуоресцирующими поликлональными антинуклеокапсидными антителами (иммунофлуоресцентный реагент).

Этот реагент представляет собой конъюгат, приготовленный из специфических поликлональных антител IgG класса к нуклеокапсидному антигену вируса и флуоресцеина изоцианата (ФИТЦ). Специфические антитела получают путем гипериммунизации животных (кроликов, хомяков или лошадей) смесью эпителиальных клеток нуклеокапсида вируса.

В настоящее время для этих целей все шире используют мышинные моноклональные антитела к нуклеокапсиду вируса бешенства. После 30-минутной инкубации при 37°C диагностические препараты многократно отмывают физиологическим раствором и дистиллированной водой.

Антитела, меченные ФИТЦ, фиксируются только в местах локализации вирусных нуклеопротеидных антигенов. Затем препараты высушивают на воздухе и исследуют методом световой микроскопии, используя в качестве источника света ксеноновую лампу и соответствующий фильтр.

При *непрямом варианте* антиген сначала соединяют с неокрашенной специфической иммунной сывороткой. Затем на образовавшиеся нефлуоресцирующие комплексы антиген-антитело воздействуют меченой флуорохромом иммунной сывороткой, содержащей антитела к белкам специфической сыворотки. Непрямой вариант МФА наряду с выявлением антигена позволяет количественно определять антитела в исследуемой сыворотке путем соответствующего ее разведения.

Меченые ФИТЦ образования в клетках разных тканей выявляются в виде желто-зеленого флуоресцентного окрашивания на темном фоне (в виде округлой или овальной формы внутрицитоплазматических включений).

Иммуноферментный анализ. Метод основан на принципе сорбции белков на твердой фазе с последующим образованием комплексов антиген-антитело, выявляемых субстрат-индикаторным раствором. Добавляемый в лунки антиген специфически связывается с антителами. На слой антигена наносят исследуемые сыворотки в нужных разведениях. При наличии в них специфических антител последние связываются с антигеном. Для выявления связывания на слой антител наносят иммуноглобулин против глобулинов сыворотки людей, конъюгированный с пероксидазой хрена. Количество сорбирующего конъюгата пропорционально количеству связавшихся с антигеном антител сывороток людей. Это можно определить, используя индикаторный раствор (ортофенилендиамин + перекись водорода), компоненты которого в результате действия пероксидазы конъюгата окрашивают жидкость в коричнево-желтый цвет. При обследовании неясных случаев применение ИФА дополнительно к методам РП или РСК позволяет увеличить достоверность лабораторной диагностики бешенства, благодаря большой чувствительности этого метода. Метод позволяет обнаруживать инфекционные и дефектные частицы.

Для определения антирабических антител в процессе вакцинации можно применять непрямой метод ИФА, используя в качестве антигена очищенный вирус, а для определения антител класса IgG в человеческой сыворотке — А-белок стафилококка, связанный с пероксидазой хрена. Результаты ИФА сравнимы с полученными в тестах вирусной нейтрализации на мышах. Метод позволяет выявлять присутствие IgM в начале процесса иммунизации.

Иммуноферментные методы — весьма перспективны для выявления нуклеокапсидного антигена вируса при посмертной диагностике в тканях головного мозга. В их числе, например, быстрый иммуноферментный метод

диагностики бешенства, основанный на приготовлении плашек сенсibilизированных антителами IgG изотипа к нуклеокапсиду первого серотипа, разведенных в карбонатном буфере.

Материал для исследования гомогенизируют в буфере или культуральной среде, осветляют центрифугированием, вносят в лунки и инкубируют в плашках. Фиксированный специфическими антителами нуклеокапсидный антиген идентифицируют добавлением пероксидазного конъюгата с антинуклеокапсидными противорабическими антителами иной видоспецифичности и хромогенного субстрата. Чувствительность метода составляет 0,8–1,0 нг/мл.

Этим методом можно выявлять антигены вирусов различных серотипов. Применение конъюгатов нуклеокапсидспецифичных антител, меченых биотином, повышает чувствительность метода до 0,1–0,2 нг/мл.

Методом ИФА успешно выявляется антиген нуклеокапсид [139], но материал, даже разложившийся, не должен фиксироваться формалином.

Метод полимеразной цепной реакции. Для экспресс-диагностики вируса бешенства и идентификации лиссавирусов наиболее удобен метод полимеразной цепной реакции (ПЦР). Метод ПЦР — самый надежный и быстрый для выделения вирионной РНК из любых проб, содержащих вирус в низкой концентрации. С его помощью можно создать много копий РНК вируса. Этот метод используется для подтверждения результатов МФА и для определения вируса в слюне, луковицах волос заднего отдела шеи и головы.

ПЦР основана на принципе естественной репликации ДНК. Суть метода заключается в многократном повторении циклов синтеза (амплификации) вирусоспецифической последовательности ДНК с помощью термостабильной Taq ДНК-полимеразы и двух специфических затравок, так называемых праймеров.

Каждый цикл состоит из трех стадий с различным температурным режимом. В каждом цикле удваивается число копий синтезируемого участка. Вновь синтезированные фрагменты ДНК служат в качестве матрицы для синтеза новых нитей в следующем цикле амплификации, что позволяет за 25–35 циклов наработать достаточное число копий выбранного участка ДНК для ее определения, как правило, с помощью электрофореза в агарозном геле.

Особенно высокая чувствительность ПЦР при использовании праймеров, комплементарных N-гену, когда удается выявлять РНК вируса в пробах, содержащих вирус в титре 10 МЛД₅₀. Методом ПЦР можно выявлять РНК вируса даже в разложившемся патологическом материале.

В настоящее время разработаны и широко используются на практике подтверждающие (конфирматорные) тесты, такие как ПЦР в обратнотранскриптазном исполнении (ОТ-ПЦР). Метод ОТ-ПЦР — высокочувствительный и наиболее эффективный. РНК экстрагируется из тканей инфицированного вирусом органа, транскрибируется в кДНК, которая затем амплифицируется методом ПЦР. Для постановки ОТ-ПЦР необходимы праймеры, полученные к консервативным областям генома вируса

бешенства. Обычно используются гены, кодирующие нуклеопротеин или N-белок.

Метод ПЦР высокоспецифичен и очень чувствителен. Является одним из наиболее точных тестов детекции рабического антигена, позволяет диагностировать бешенство даже при наличии в материале хотя бы одного вириона. В основе теста лежит комплементарное достраивание РНК-матрицы, осуществляемое *in vitro* с помощью фермента РНК-полимеразы. В последние годы ПЦР находит все более широкое применение для диагностики и мониторинга вирусных инфекций. Однако методика проведения сложна, дорогостояща и пока недостаточно унифицирована для рутинного применения.

Цитологические методы в настоящее время имеют ограниченное диагностическое значение, но при ряде инфекций по-прежнему должны применяться. Исследуются материалы аутопсии, биопсии, мазки, которые после соответствующей обработки окрашиваются и анализируются под микроскопом. При бешенстве — это выявление включений в цитоплазме клеток (тельца Бабеша – Негри).

Выделение вируса. Выделение вируса может быть необходимым для подтверждения результатов тестов по определению антигена и для более детальной характеристики изолятов. И хотя этот метод является одним из самых старых и трудоемких методов диагностики, сегодня выделение вируса с последующей идентификацией с помощью одного из современных методов (ИФА с моноклональными антителами или ПЦР) является наиболее достоверным методом диагностики, т. н. «золотой стандарт».

Результативность методов диагностики бешенства может варьировать в зависимости от ряда факторов (стадии болезни, сроков забора материала, качества полученных проб, условий их хранения, опытности персонала, качества реактивов и др.). Если положительный результат подтверждает бешенство, то отрицательный не всегда свидетельствует об отсутствии болезни. Поэтому при бешенстве эксперты ВОЗ рекомендуют использовать несколько тестов, особенно МФА в сочетании с биопробой на новорожденных (2–3 дневных) белых мышах.

Меры личной профилактики

Все работы с материалом, предположительно содержащим вирус бешенства, равно как и с животными, подозрительными на бешенство, должны проводиться с соблюдением мер личной безопасности. Медицинские работники и ветеринарные врачи должны работать в халатах, перчатках, масках.

По окончании работы боксы обрабатывают 3% раствором перекиси водорода.

Флаконы, ампулы и инструменты, а также оставшиеся материалы, содержащие вирус бешенства, и всю посуду после работы обеззараживают автоклавированием в течение 1 ч при 1,5 атм (режим «убивки»).

Средства индивидуальной защиты обеззараживают кипячением или автоклавированием. Рабочую поверхность стола и руки обеззараживают дезраствором (0,5% раствор хлорамина).