

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть

6 марта 2008 г.

Регистрационный № 058-0807

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОРНЕАЛЬНОГО ТЕСТА
ДЛЯ ПРИЖИЗНЕННОЙ ЭКСПРЕСС-ДИАГНОСТИКИ БЕШЕНСТВА
У ЧЕЛОВЕКА И ЖИВОТНЫХ**

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

АВТОРЫ: д-р биол. наук Н.П. Мишаева, д-р вет. наук, проф., акад. НАН
Беларуси Н.А. Ковалев, канд. мед. наук С.О. Вельгин, В.В. Щерба

Минск 2008

Инструкция предназначена для инфекционистов и неврологов с целью проведения ранней лабораторной диагностики бешенства у больных с клиническими проявлениями заболевания, или у неврологических больных неясной этиологии, имевших в анамнезе укус животного, при подозрении на бешенство, в том числе на атипичное течение заболевания. Инструкция предназначена также для ветеринарных работников для прижизненной диагностики бешенства у животных, неспровоцированно покусавших людей, чтобы решить вопрос о необходимости назначении покусанным лицам курса антирабических прививок и не прививать людей, покусанных здоровыми животными.

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.

Предметные стекла СП-3, у которых тщательно отшлифованы края, что является гарантией безопасности при взятии отпечатков (чтобы во время манипуляции не травмировать глазное яблоко). Середина стекла или один его край должны быть зашлифованы (на 1,5–2 см) для нанесения простым карандашом сведений о больном (человеке, животном). Стекла должны быть обезжиренными (в смеси спирт – эфир в соотношении 1:1) и стерильными.

Широкогорлый флакон, куда помещается не менее 10 стекол для фиксации ацетоном отпечатков роговицы. Лучше всего для этой цели подходят градуированные флаконы объемом 50 мл.

Стаканы стеклянные высокие номинальной емкостью 50–100 мл.

Чашки Петри.

Спиртовка.

Пипетки П1-1,0; П1-10,0 мл ТУ 64-339-81 или аналогичные.

Пинцет анатомический.

Резиновые перчатки.

Маски.

Вода дистиллированная ГОСТ 6709-72.

Диагностический антирабический флюоресцирующий иммуноглобулин.

Иммуноглобулин флюоресцирующий контрольный.

Ацетон.

Забуференный стерильный физиологический раствор (ФСБ) pH = 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.

Принцип метода

Корнеальный тест основан на том, что у зараженных бешенством человека или животного вирус после накопления в головном и спинном мозге по периферическим нервам продвигается в центробежном направлении и проникает в роговицу, имеющую самые короткие нервные связи с центральной нервной системой. Роговица обильно снабжена нервными рецепторами, находящимися в непосредственном контакте с эпителиальными клетками, что способствует множественному поражению последних вирусом, который можно выявить прямым МФА за несколько дней до развития клиники. В роговице, подобно коже и слизистым оболочкам, происходит постоянное слущивание эпителиальных клеток, что делает ее удобным объектом для исследования.

Корнеальный тест применяется с целью ранней лабораторной диагностики бешенства прижизненно путем исследования отпечатков роговицы глаза человека или животного на наличие рабического антигена методом флуоресцирующих антител.

Данный метод экспресс-диагностики является доступным, с его помощью можно установить наличие антигена рабического вируса в течение 2–5 ч. По результатам иммунофлуоресцентного исследования отпечатков роговицы можно поставить предварительный диагноз «бешенство» в инкубационном периоде за несколько (1–7) дней до клинического проявления заболевания. Это крайне важно для своевременного назначения адекватного лечения лицам, пострадавшим от укусов животных, при первичном обращении их в медицинское учреждение с жалобами на недомогание.

Особую ценность корнеальный тест представляет для обследования внешне здоровых домашних животных (собак, кошек), неспровоцированно покусавших людей, в том числе собственных хозяев. В таких случаях, чтобы избежать прививок антирабической вакциной, хозяева животных хотели бы обследовать своих питомцев прижизненно, но до сих пор ветеринары просят принести на обследование голову животного, так как они исследуют только мозг.

Разработка метода прижизненной экспресс-диагностики бешенства вызвана тем, что до настоящего времени в Беларуси лабораторная диагностика заболевания не проводилась, а при неспровоцированных укусах животными людей последним (согласно Инструкции по применению антирабических вакцин) назначались прививки против бешенства независимо от того, покусало человека больное животное или здоровое.

Чувствительность метода

Метод обладает высокой чувствительностью и позволяет выявлять даже единичные светящиеся точки (комплекс антиген + антитело) за несколько дней до начала проявления клинических признаков. Эффективность выявления антигена зависит от инфицирующей дозы вируса, попавшего в организм человека или животного, от сроков, прошедших после инфицирования и интенсивности репродукции вируса в ЦНС.

Приготовление отпечатков роговицы

Взятие отпечатков роговицы у стационарных больных (при подозрении на заболевание бешенством, в т. ч. с нехарактерными для этой инфекции симптомами) должно производиться врачом-офтальмологом, а у животных — ветеринаром. Предварительно с целью анестезии в конъюнктивальный мешок закапывается 1 капля лидокаина (0,25–0,5%) или дикаина (0,5%), при этом местноанестезирующее действие наступает через 2–3 мин и продолжается не менее 6–8 мин. Затем большим и указательным пальцами раскрывают глазную щель и на слегка выпяченное глазное яблоко легко надавливают поверхностью стерильного стекла, отступив 0,5 см от края. С каждого глаза желательно сделать 2 отпечатка.

Для отпечатков роговицы используют тщательно обезжиренные предметные стерильные стекла с зашлифованными краями. Для получения отпечатков роговицы у больных детей, имевших в анамнезе укус животного, а также у мелких животных (котят, хомяки, крысы), покусавших человека, при подозрении на заболевание их бешенством лучше использовать узкие стекла шириной около 10 мм. В остальных случаях можно использовать 8-луночные стекла (обезжиренные).

У животных, как подозрительных на заболевание бешенством, так и у клинически здоровых, покусавших людей, отпечатки роговицы глаза следует проводить с соблюдением мер личной безопасности. В этих целях на руки надевают резиновые перчатки, лицо от попадания брызг слюны защищают марлевой повязкой и очками. Голову животного во избежание нанесения им укусов или царапин надежно фиксируют (намордник для собак, плотная ткань для других видов). Животных, которые ведут себя беспокойно, можно временно обездвижить (наркоз).

Отпечатки роговицы глаз животных получают вышеуказанным методом. При работе с животными во время надавливания стеклом на глазное яблоко необходимо следить, чтобы животное не моргало третьим веком, так как при этом с глазного яблока удаляются эпителиальные клетки, и получается некачественный отпечаток. В случае нанесения данным животным серьезных увечий человеку и возникновении вопроса о комплексном применении вакцины и антирабического иммуноглобулина, можно сделать соскоб с роговицы. Учитывая, однако, что эта операция болезненная, животное в обязательном порядке следует обездвижить (ввести в наркоз), чтобы оно не вырвалось и не покусало людей.

Фиксация отпечатков

Отпечатки фиксируют в ацетоне при $-18\pm 2^{\circ}\text{C}$ на протяжении 30 мин. После фиксации препараты прополаскивают в ФСБ $\text{pH} = 7,4\pm 0,2$ и дистиллированной воде, затем их высушивают на воздухе в течение 4 ч при температуре $+4^{\circ}\text{C}$ или путем 5-8 кратной проводки над пламенем горелки.

Перед окраской отпечатков их контуры очерчивают карандашом по стеклу с обратной стороны. На зашлифованной поверхности стекла отмечается номер обследуемого (человека или животного), дата взятия отпечатка и другие данные.

Если нет возможности исследовать зафиксированные отпечатки сразу же, их помещают в пластмассовую чашку Петри, закрывают крышкой. В таком состоянии они хранятся при $2-6^{\circ}\text{C}$ до момента исследования.

Окраска отпечатков

Для окрашивания отпечатков используют диагностический антирабический флуоресцирующий иммуноглобулин (ДАФИ). Ампулу с ДАФИ вскрывают, ее содержимое разводят в 1 мл дистиллированной воды и центрифугируют при 1500 об./мин на протяжении 5 мин для очищения. Это исходный раствор ДАФИ, его можно использовать в течение 12–14 дней при условии хранения при температуре 4°C . Для окрашивания мазков из исходного раствора готовят «рабочий раствор», для чего к 1 мл исходного раствора ДАФИ добавляют фосфатно-буферный солевой раствор $\text{pH} = 7,2-7,4$ до «рабочего разведения», указанного на этикетке. Рабочее разведение раствора пригодно для одноразового использования.

На зафиксированные препараты-отпечатки осторожно (каплями) наносят рабочее разведение конъюгированного изотиоцианатом антирабического γ -глобулина (0,1 мл на мазок), разбавленного в соответствии с его рабочим разведением, которое указано на этикетке. Отпечатки должны быть полностью покрыты раствором ДАФИ. Затем препараты помещают во влажную камеру (чашку Петри или закрытый стерилизатор, на дно которых помещена смоченная дистиллированной водой фильтровальная бумага и тампоны влажной ваты) и выдерживают в термостате (37°C) в течение 30 мин.

Параллельно окрашивают контрольные мазки глобулином флуоресцирующим и глобулином контрольным.

Для удаления флуоресцирующих антител, не связывающихся с антигеном, препараты отмывают в течение 1 ч 0,01М фосфатным буферным раствором ($\text{pH} = 7,2-7,4$) с двукратной сменой ФСБ, осторожно ополаскивают дистиллированной водой и высушивают на воздухе в вертикальном положении.

Перед оценкой результатов выявления антигена в отпечатках роговицы проводят гашение неспецифического свечения, которое может наблюдаться в некоторых эпителиальных клетках отпечатков роговицы как больных бешенством, так и здоровых животных, что затрудняет

интерпретацию результатов. Для гашения неспецифического свечения в отпечатках роговицы используют раствор синьки Эванса (1 капля 1% раствора, конечное разведение 1:2000, экспозиция – 3 мин).

Для предотвращения выгорания слайдов во время просмотра под люминесцентным микроскопом на отпечаток наносят каплю монтирующей жидкости и покрывают покровным стеклом. Монтирующую жидкость готовят из 1,25 г DABCO, 4,8 г поливинилового спирта, 0,8 г Tris-HCL и 50 мл дистиллированной воды.

Иммунолюминесцентное микроскопирование

Отпечатки просматривают под люминесцентным микроскопом. При наличии антигена вируса бешенства в поле зрения микроскопа в протоплазме многих эпителиальных клеток на темном серо-зелено-желтом фоне ткани, вирусные антигены выявляются в виде яркосветящихся желто-зеленых структур (очажков) разной формы, варьирующих по величине от мельчайших пылевидных точек до 2 мкм и более.

Форма светящихся очажков, их количество в клетках и размеры у различных видов животных существенно не отличаются. Протоплазма и ядро эпителиальных клеток светятся тусклым желтовато-зеленым цветом. Вирусный антиген при люминесцентной микроскопии можно выявить в отпечатках, полученных из роговицы глаза человека или животного, находящихся в конце инкубационного периода или на ранних стадиях заболевания.

При просмотре отпечатков проводится сравнение их с контрольными (+ и –) отпечатками, полученными от здоровых субъектов. С целью получения достоверных результатов в каждом отпечатке просматривают по 50–100 клеток, а всего не менее 200–400 клеток. Причем учитываются только клетки, имеющие четкую структуру и расположенные на чистом фоне.

Оценка результатов

Учитывая, что антиген вируса бешенства может появляться в роговице глаза за несколько дней до развития клиники, и его количество возрастает к началу развития клинических проявлений, следует учитывать сроки забора отпечатков и сопоставлять их с эпидемиологическими и клиническими данными. Результаты микроскопии считают положительными, если в нескольких полях зрения микроскопа имеется достаточное количество (не менее 10) типичных гранул (мелких, средних или крупных) с ярким желто-зеленым свечением при условии отсутствия таких гранул в контрольных образцах.

Реакцию оценивают по интенсивности специфического свечения в крестах:

«++» – интенсивное свечение (до 10 очажков свечения в нескольких полях зрения микроскопа);

«+» – свечение единичных клеток;

«←» – свечение отсутствует.

Если в исследуемом препарате обнаруживают светящиеся точки и структуры, сравнимые по величине с тельцами Негри, это свидетельствует о высоком содержании вируса в ЦНС (от 3,0 lg LD₅₀ и выше).

Если в исследуемом отпечатке отмечаются лишь единичные мельчайшие флюоресцирующие частицы или точки (при отсутствии подобных светящихся структур в контрольных образцах), это свидетельствует о низком содержании вируса в ЦНС (около 1,0 lg LD₅₀).

При отсутствии светящихся точек в препарате делают предварительный вывод, что животное во время укуса было здоровым, и пострадавшее лицо не нуждается в прививках. В сомнительных случаях (очень тяжелые травмы, неадекватное поведение животного) нужно сделать повторные роговичные отпечатки, учитывая доступность роговицы как объекта исследования, с одной стороны, и трагический исход такого грозного заболевания как бешенство, с другой.

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).