

RPS Аденодетектор для экспресс-диагностики аденовирусного конъюнктивита

Майчук Ю.Ф., Зайцева О.В.

ФГУ «Московский НИИ глазных болезней им. Гельмгольца Росмедтехнологий», Москва

Острые конъюнктивиты составляют 30% всей офтальмопатологии и являются основными клиническими формами глазной инфекции – 66,7% от общего числа больных с воспалительными заболеваниями глаз. Конъюнктивиты являются одной из основных причин временной нетрудоспособности больных с заболеваниями органа зрения [3, 4].

По результатам диагностики методами иммунофлюоресцентного окрашивания в культуре клеток (метод флюоресцирующих антител, МФА) и/или полимеразно-цепной реакции (ПЦР) частота аденовирусной этиологии подтверждается в 15–70% случаев всех конъюнктивитов [1, 5, 6, 9–11]. Аденовирусы вызывают главным образом две клинические формы заболевания: аденовирусный конъюнктивит (фаринго-конъюнктивальная лихорадка) и эпидемический кератоконъюнктивит. Возбудителями аденовирусного конъюнктивита являются аденовирусы серотипов 3, 4, 6, 7а, реже – 1, 5, 10, 16. Эпидемический кератоконъюнктивит вызывается возбудителями серотипов 8, 11, 19, реже – 2, 3а, 7, 9, 14, 29, 37 [2–4]. Особая медико-социальная значимость проблемы аденовирусного поражения глаз связана с преимущественно эпидемическим характером инфекции, имеющей в 70% случаев госпитальное происхождение [2, 3].

Предварительный диагноз аденовирусного конъюнктивита устанавливается на основании клинической картины и анамнеза заболевания. Однако достаточно часто дифференциальная диагностика между конъюнктивитом аденовирусной, бактериальной или аллергической природы бывает затруднительна. На основании анализа

большого числа клинических данных, в том числе базы клинических исследований, Rietveld R.P. с соавторами пришел к заключению, что не существует каких-либо очевидных симптомов, позволяющих достоверно отличить вирусный конъюнктивит от конъюнктивита иной этиологии [12].

В настоящее время для верификации диагноза аденовирусного конъюнктивита используют МФА, серологические методы, ПЦР. МФА имеет существенные ограничения, так как выявляет только частицы жизнеспособных аденовирусов. Это требует сбора достаточного количества материала, содержащего живые вирусы, поддержания их жизнеспособности в течение транспортировки, обеспечения роста вируса на питательной среде и высокого профессионализма лаборантов, анализирующих цитопатический эффект.

Метод ПЦР был впервые использован для лабораторной диагностики офтальмопатологии в 1990 году и с тех пор получил широкое распространение в клинической практике. Метод выявляет очень малые количества вирусной ДНК, демонстрируя более высокую чувствительность в сравнении с клеточными технологиями и сохраняя при этом высокую специфичность [7, 8]. В настоящее время ПЦР является главным стандартом гистологической диагностики аденовирусного поражения глаз.

Недостатком МФА и ПЦР является отсроченность получения результата, а также необходимость сложного оборудования и квалифицированного персонала в условиях специализированной лаборатории.

В связи с этим предпринимались неоднократные попытки разработки

скрининговых методик диагностики аденовирусного поражения глаз на основе ферментного иммунного анализа, метода иммунофльтрации, прямой иммунофлюоресценции, электронной микроскопии и разновидностей иммунохроматографии. Однако в большинстве случаев предложенные методы либо показывали недостаточную чувствительность или специфичность, либо требовали сложного дорогостоящего оборудования, что обусловило невозможность их широкого применения [1,11].

Разработанный компанией Rapid Pathogen Screening, RPS Аденодетектор предназначен для экспресс-диагностики аденовирусного поражения глаз на основе качественного анализа аденовирусных антигенов – гексон-протеинов – в слезной жидкости.

Действие RPS Аденодетектора основано на принципе латеральной проточной иммунохроматографии. Этот метод является последней разработкой и в настоящее время наиболее широко используется для диагностических экспресс-методов, в том числе для экспресс-диагностики ВИЧ-инфекции. Суть данного метода заключается в следующем. Биологическая проба наносится на полоску и, смешиваясь с сигнальным реактивом, мигрирует по ее длине. Два антиген-специфичных антитела, фиксированные на тест-полоске, «захватывают» антиген, при этом одно антитело иммобилизовано в детекторной зоне тест-полоски, а другое мечено коллоидным золотом – красителем, который легко можно идентифицировать даже в самых малых концентрациях. Положительная реакция проявляется

в виде линии, возникающей в месте реакции антигена с антителом.

RPS Аденодетектор обнаруживает общие эпитопы на гексон-протеине аденовируса в пределах области, общей для всех серотипов. Это позволяет выявлять любой из известных серотипов аденовируса.

RPS Аденодетектор состоит из двух частей: стерильного наконечника с мягкой абсорбирующей прокладкой для сбора слезной жидкости и тест-полоски с фиксированными на ней антителами для иммунного анализа, заключенной в пластиковую кассету. Кассета защищает зону иммунологического анализа от каких-либо внешних воздействий и обеспечивает оптимальное поступление биологической пробы к активной зоне тест-полоски. Прибор отличается высоким качеством антител благодаря особым способам получения, очистки и фиксации на носителе.

Постановка диагностической пробы может осуществляться в кабинете врача-офтальмолога, производится в один этап, не требует особых навыков и занимает около 10 минут.

Исследование не нуждается в анестезии. Забор слезной жидкости желательнее проводить до использования каких-либо препаратов местно. Если пациент уже применял какие-либо препараты, необходимо выждать как минимум 30 минут после закапывания глазных капель и 2 часа после использования мазевых препаратов.

После оттягивания вниз нижнего века по конъюнктиве нижнего свода в его медиальной части осуществляют 3-4 скользящих движения наконечником. Мягкая прокладка наконечника быстро абсорбирует необходимое количество слезной жидкости. После забора слезной жидкости наконечник вставляют в кассету с тест-полоской для иммунного анализа. Наружную часть тест-полоски затем помещают в прилагаемую пробирку с буферным солевым раствором на 10-15 секунд, удаляют из раствора и оставляют на 10 минут. Слезная жидкость, смешиваясь с раствором, мигрирует по длине тест-полоски.

Оценка результата проводится через 10 минут. По истечении периода времени от 1 до 10 минут на тест-полоске появляется одна или две красные линии. При наличии одной, контрольной, линии результат теста считается отрицательным. При наличии в слезной жидкости аденовирусных антигенов на тест-полоске появляются две линии, что расценивается как положительный результат теста (вторая линия появляется на том месте, где на тест-полоске нанесены антитела к вирусу). Отсутствие линий означает неправильность постановки теста.

Клинические исследования прибора были проведены на базе 5 медицинских центров США и Германии. Для оценки чувствительности, специфичности и точности RPS Аденодетектора в диагностике аденовирусного конъюнктивита было организовано проспективное маскированное мультицентровое исследование, в котором показатели скринингового тестирования сравнивались с результатами, полученными с помощью МФА и ПЦР. В исследовании приняли участие 186 пациентов с клинической картиной острого аденовирусного конъюнктивита. Каждый пациент был обследован с помощью перечисленных трех методик. В сравнении с МФА чувствительность RPS составила 88%, специфичность – 91%. При использовании ПЦР как эталонного метода чувствительность RPS составила 89%, специфичность возросла до 94%. Соответствие между результатами МФА и RPS Аденодетектора отмечалось в 98% случаев с положительным результатом и в 94% случаев с отрицательным результатом [13].

Некоторые различия результатов трех диагностических методов связаны с различием объектов исследования. RPS Аденодетектор выявляет наличие аденовирусных антигенов – гексон-протеинов – в образце слезной жидкости. Клеточные культуры используют инфекционный цикл живых аденовирусов, что требует нали-

чия в образце хотя бы одного жизнеспособного вируса. ПЦР идентифицирует геном вируса, при этом лимит обнаружения частиц ДНК в образце составляет для данного метода 17 последовательностей. Хотя для аденовируса не характерна персистенция, иногда ДНК вируса выявляется через несколько месяцев после перенесенного острого процесса, что обуславливает положительные реакции при ПЦР-диагностике [7].

Лимит выявления антигенов вируса для RPS составляет 500 вирусных частиц или 300 пг гексон-протеина, поэтому положительный результат теста свидетельствует об активной фазе заболевания. В то же время следует учитывать, что положительные результаты теста с использованием RPS Аденодетектора могут быть в ряде случаев обусловлены длительным сохранением антигенов вируса в слезной жидкости.

При интерпретации результатов теста с использованием RPS Аденодетектора возможны следующие варианты: отрицательный (проявляется одна красная линия), слабо положительный (вторая красная линия едва заметна), умеренно положительный (вторая линия бледно-красная, нечеткая), резко положительный (явно проявляются две красные линии). Степень проявления второй (диагностической) красной линии зависит от количества вирусных антигенов в образце. Слабо положительный результат характерен для присутствия 500 вирусных частиц в образце слезной жидкости. Высокое содержание вирусных антигенов (резко положительный результат) характерно для первых 5-7 дней от начала заболевания.

В сравнении с другими методами быстрой диагностики аденовирусного конъюнктивита, описанными в литературе, RPS демонстрирует достоверно более высокую чувствительность и сравнимую специфичность. К примеру, система быстрой диагностики SAS Adeno Test (SA Scientific, San Antonio, TX) в сравнении с методом

RPS Аденодетектор: тестер для экспресс-диагностики аденовирусной инфекции

RPS Аденодетектор предназначен для экспресс-диагностики аденовирусного поражения глаз на основе качественного анализа аденовирусных антигенов – гексон-протеинов – в слезной жидкости.

Действие RPS Аденодетектора основано на принципе латеральной проточной иммунохроматографии, при которой обнаруживаются все известные серотипы аденовируса.

Чувствительность теста составляет 89%, его специфичность – 94%.

Для полноценного анализа требуется менее 10 мкл слезной жидкости. Лимит выявления антигенов вируса составляет 500 вирусных частиц или 300 пг гексон-протеина, поэтому положительный



результат теста свидетельствует об активной фазе заболевания.

Процесс анализа занимает около 10 минут.

Преимущества RPS Аденодетектора:

- Высокоинформативный диагностический прибор
- Прост в использовании: исследование проводится в кабинете офтальмолога без применения лабораторного оборудования
- Быстрое получение результата

Процесс анализа слезной жидкости



1. Сбор слезной жидкости



2. Тестирование



3. Получение результатов



Отрицательный результат



Положительный результат

ПЦР показала чувствительность 54% и специфичность 97% [14]. Более высокая чувствительность RPS Аденодетектора объясняется усовершенствованной методикой сбора и анализа материала. В отличие от вышеназванной системы RPS не предполагает дополнительных шагов в виде экстракции и дилуции антигена. Для полноценного анализа в системе RPS требуется менее 10 мкл слезной жидкости. Простота тестирования значительно облегчает использование RPS Аденодетектора в клинике, не требует специального обучения персонала.

Таким образом, RPS Аденодетектор является высокочувствительным и специфичным прибором для быстрой диагностики аденовирусного конъюнктивита, отличающимся простотой и удобством постановки теста, надежностью (каждый тест имеет встроенный внутренний контроль) и экономичностью. Постановка правильного диагноза уже на первичном приеме позволит назначить пациенту адекватное лечение, избежать необоснованного использования антибиотиков с сопутствующими неблагоприятными побочными эффектами антибиотикотерапии и ростом антибиотикорезистентности. Раннее выявление

контагиозного заболевания позволит своевременно рекомендовать пациенту правила поведения, способствующие профилактике распространения инфекции. Совокупность факторов приводит к экономическому эффекту благодаря оптимизации затрат на лечение, сдерживанию распространения инфекции и профилактике развития осложнений.

Литература

1. Анджелов В.О., Кричевская Г.И., Хилько С.Н., Кирасова М.А., Конева Е.Б. Иммуноферментный анализ в диагностике аденовирусных заболеваний глаз // Вестн. офтальмологии. – 1988. – № 6. – С. 75-77.
2. Анджелов В.О., Майчук Ю.Ф., Кричевская Г.И., Конева Е.Б. Профилактика вспышек аденовирусных заболеваний глаз // Вестн. офтальмологии. – 1989. – № 2. – С. 65-67.
3. Майчук Ю.Ф. Вирусные заболевания глаз. – М., 1981. – 272 с.
4. Майчук Ю.Ф., Яни Е.В. Офтальмоферон в лечении аденовирусных заболеваний глаз // Окулист. – 2006. – № 5 (81). – С. 18-19.
5. Adleberg J.M., Wittwer C. Use of the polymerase chain reaction in the diagnosis of ocular disease // Curr. Opin. Ophthalmol. – 1995. – Vol. 6. – P. 80-85.
6. Aoki K., Tagawa Y. A twenty-one year surveillance of adenoviral conjunctivitis in Sapporo, Japan // Int. Ophthalmol. Clin. – 2002. – Vol. 42. – № 1. – P. 49-54.

7. Cooper R.J., Yeo A.C. et al. Adenovirus polymerase chain reaction assay for rapid diagnosis of conjunctivitis // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. – 1999. – Vol. 40. – P. 90-95.

8. Della G.N. Molecular biology in ophthalmology: a review of principles and recent advances // Arch. Ophthalmol. – 1996. – Vol. 114. – P. 457-463.

9. Isenberg S.J., Apt L. et al. A controlled trial of povidon-iodine to treat infectious conjunctivitis in children // Am. J. Ophthalmol. – 2002. – Vol. 134. – P. 681-688.

10. Ishii K., Nakazono N. et al. Comparative studies on aetiology and epidemiology of viral conjunctivitis in three countries of East Asia – Japan, Taiwan and Korea // Int. J. Epidemiol. – 1987. – Vol. 16. – P. 98-103.

11. Kowalski R.P., Gordon Y.J. Comparison of direct rapid tests for the detection of adenovirus antigen in routine conjunctival specimens // Ophthalmology. – 1989. – Vol. 96. – P. 1106-1109.

12. Rietveld R.P., van Weert H.C. et al. Diagnostic impact of signs and symptoms in acute infectious conjunctivitis: systematic literature search // BMJ. – 2003. – Vol. 327. – P. 789.

13. Sambursky R., Tauber S. et al. The RPS Adeno Detector for diagnosing adenoviral conjunctivitis // Ophthalmology. – 2006. – Vol. 113. – № 10. – P. 1758-1764.

14. Uchio E., Aoki K. et al. Rapid Diagnosis of adenoviral conjunctivitis on conjunctival swabs by 10-minute immunochromatography // Ophthalmology. – 1997. – Vol. 104. – P. 1294-1299.