

СМИРНОВА ДАРЬЯ НИКОЛАЕВНА

**РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОБРАЗЦА
ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ
ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БЕЛКА
ПАТОГЕННОСТИ CagA *Helicobacter pylori***

03.02.03 Микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Оболенск – 2020

Работа выполнена на кафедре микробиологии Института биологии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Вятский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Киров.

Научный руководитель:

Богачёва Наталья Викторовна, доктор медицинских наук (20.02.23), доцент, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Кировский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Киров, кафедра микробиологии и вирусологии, профессор кафедры; Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Вятский государственный университет» Министерства науки и высшего образования Российской Федерации, г. Киров, Институт биологии и биотехнологии, кафедра микробиологии, профессор кафедры.

Официальные оппоненты:

Краева Людмила Александровна, доктор медицинский наук (03.02.03 – микробиология), Федеральное бюджетное учреждение науки «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Санкт-Петербург, лаборатория медицинской бактериологии, заведующая лабораторией.

Мавзютов Айрат Радикович, доктор медицинских наук (03.02.03 – микробиология), профессор, заслуженный деятель Республики Башкортостан, Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Башкирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г. Уфа, кафедра фундаментальной и прикладной микробиологии, заведующий кафедрой.

Ведущая организация: Федеральное казенное учреждение здравоохранения Российский научно-исследовательский противочумный институт «Микроб» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, г. Саратов.

Защита диссертации состоится «18» декабря 2020 г. в 11-00 ч на заседании диссертационного совета Д 350.002.01 при Федеральном бюджетном учреждении науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу: Территория «Квартал А», д. 24, р.п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская область, 142279, ФБУН ГНЦ ПМБ.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Федерального бюджетного учреждения науки «Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека Российской Федерации по адресу: Территория «Квартал А», д. 24, р.п. Оболенск, г.о. Серпухов, Московская область, 142279, ФБУН ГНЦ ПМБ.

Автореферат разослан «__» _____ 2020 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 350.002.01
кандидат биологических наук



Фурсова Надежда Константиновна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. По данным литературы, инфицированность населения *Helicobacter pylori* находится на высоком уровне как в России, так и во всем мире. В развивающихся странах *H. pylori* заражено 80,0-90,0 %, в странах Западной Европы – 30,0-50,0 %, в Северной Америке – 30,0-40,0 %, в Австралии – 20,0 % населения (Габибов, 2017). В России инфицированность данными микроорганизмами взрослого населения достигает 84,0 % (Маев и др., 2013).

При колонизации *H. pylori* в слизистой оболочке желудка развивается воспалительный процесс, который в преобладающем числе случаев протекает в форме хронического гастрита. В 20,0 % случаев хронический процесс переходит в острую форму, что повышает риск развития язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и желудка, аденокарциномы желудка. Также отмечено, что у 90,0 % пациентов развивается MALT-лимфома желудка, ассоциированная с *H. pylori* (Файзуллина и др., 2010).

Наиболее выраженные патологические процессы, связанные с повышенным риском опухолевой трансформации, вызывают штаммы *H. pylori*, вырабатывающие цитотоксин CagA. Ген *cagA* является маркером «островка патогенности» микроорганизма, а экспрессируемый этим геном белок приводит к нарушению целостности эпителия слизистой желудка, индуцирует неконтролируемую пролиферацию лимфоидных и эпителиальных клеток, стимулирует секрецию противовоспалительных цитокинов (Климович и др., 2010). Известно, что у пациентов, страдающих хеликобактериозом, вызванным *cagA*-положительными штаммами (*cagA*⁺), риск развития кишечной метаплазии в 12 раз, а атрофического гастрита в 3 раза выше по сравнению с инфицированными *cagA*-отрицательными штаммами (*cagA*⁻) (Осадчук, 2012).

Распространенность злокачественных новообразований среди населения России находится на высоком уровне. Согласно докладу Московского научно-исследовательского онкологического института им. П. А. Герцена «Состояние онкологической помощи населению России в 2018 г.», за 2018 г. в России зарегистрировано около 625 тыс. новых случаев онкологических заболеваний. При этом распространенность злокачественных новообразований среди населения России в 2018 г. составила 2562,1 на 100 тыс. населения, что выше уровня 2008 г. (1836,6) на 39,5 % (Каприн и др., 2019). Установлено, что инфицирование *H. pylori* является причиной 327 тыс. новых случаев рака желудка в год (Сенчукова и др., 2009).

В связи с этим для скрининга лиц, инфицированных *H. pylori*, актуальна и перспективна разработка высокоспецифичных, чувствительных, простых и недорогих методов диагностики хеликобактериоза, к которым относятся иммунохроматографические тест-системы, позволяющие в короткий срок определить наличие в пробе детектируемого антигена (Исаков и др., 2005).

В настоящее время в России отсутствуют иммунохроматографические тест-системы для выявления антигенов патогенности *H. pylori* отечественного производства, имеются лишь зарубежные аналоги, не лишенные недостатков.

Степень разработанности темы исследования. В настоящее время на отечественном рынке представлены несколько зарубежных иммунохроматографических тест-систем, которые предназначены исключительно для качественного определения *H. pylori* в фекалиях, без дифференцировки патогенности микроорганизма («ImmunoCard STAT HpSA», «Meridian Bioscience», США; «Хелико Стик», «Novamed», Израиль; «SD BIOLINE *H. pylori* Ag», «Standard Diagnostics», Республика Корея). Стоит отметить, что иммунохроматографическая тест-система «Хелико Стик» («Novamed», Израиль) направлена на выявление не самого микроорганизма, а фермента уреазы, который, кроме *H. pylori*, способны вырабатывать другие возбудители инфекционных заболеваний.

На российском рынке отсутствуют иммунохроматографические тест-системы, состоящие из отечественных иммунохимических компонентов, предназначенные для выявления антигена патогенности CagA *H. pylori* в различном биологическом материале.

Цель исследования – создать экспериментальный образец иммунохроматографической тест-системы для выявления высокопатогенных CagA-положительных штаммов *H. pylori*.

Задачи исследования

1. Выделить и идентифицировать CagA⁺ штаммы *H. pylori* из биологического материала лиц с хроническими заболеваниями желудка и двенадцатиперстной кишки.

2. Разработать способ получения кондиционного препарата наночастиц коллоидного золота с диаметром 25-30 нм.

3. Создать экспериментальный образец иммунохроматографической тест-системы для выявления белка патогенности CagA *H. pylori*.

4. Разработать методику повышения чувствительности иммунохроматографической тест-системы с применением лактата серебра и гидрохинона.

5. Сравнить результаты выявления CagA⁺ штаммов *H. pylori* иммунохроматографическим и молекулярно-генетическим методами.

Научная новизна

1. Впервые с использованием выделенных и идентифицированных штаммов *H. pylori* были разработаны способ определения чувствительности данного вида микроорганизмов к антибиотикам и способ моделирования хеликобактериоза. Научная новизна подтверждена патентами на изобретения: № 2588469 «Способ определения чувствительности *H. pylori* к антибиотикам» от 27.06.2016 г.; № 2690943 «Способ моделирования хеликобактериоза» от 07.06.2019 г.

2. Впервые предложена методика получения наночастиц коллоидного золота со средним диаметром 25-30 нм, представляющая собой пошаговый алгоритм, учитывающий условия внесения реагентов (ЗХВК и цитрата натрия), режимы перемешивания и температуру нагревания растворов. Научная новизна подтверждена патентом на изобретение: № 2644466 «Способ получения

наночастиц коллоидного золота со средним диаметром 25-30 нм» от 12.02.2018 г.

3. Впервые разработана иммунохроматографическая тест-система, в состав которой вошли специфические иммунохимические компоненты отечественного производства, направленная на выявление белка CagA *H. pylori* в различном биологическом материале. Научная новизна подтверждена патентом на изобретение № 2642588 «Имунохроматографическая тест-система для выявления патогенных штаммов *Helicobacter pylori*» от 25.01.2018 г.

4. Впервые с использованием комплекса статистических методов выполнен сравнительный анализ выявления CagA-положительных штаммов *H. pylori* иммунохроматографическим и молекулярно-генетическим методами, который позволяет утверждать о возможности использования иммунохроматографического метода для отбора пациентов, нуждающихся в назначении и контроле рациональной антихеликобактерной терапии.

Теоретическая и практическая значимость работы. Теоретическая значимость работы заключается в систематизации данных об антигенном строении бактерий *H. pylori*, обосновании целесообразности выявления высокопатогенных штаммов *H. pylori*, секретирующих белок CagA, у лиц с заболеваниями желудочно-кишечного тракта.

Кроме этого, в работе проведен анализ оснащенности Российского рынка иммунохроматографическими тест-системами для диагностики хеликобактериоза. Научно обоснована целесообразность разработки и использования иммунохроматографической тест-системы, состоящей из иммунохимических компонентов отечественного производства, для детекции патогенных штаммов *H. pylori* в различном биологическом материале пациентов в качестве метода выявления лиц, нуждающихся в обоснованном назначении антихеликобактерной терапии.

Систематизированы результаты научных исследований, направленных на поиск путей повышения специфичности и чувствительности иммунохроматографических тест-систем. Показана зависимость качества разрабатываемых иммунохроматографических тест-систем от оптимального размера наночастиц коллоидного золота, концентрации специфических иммунохимических компонентов, выбора состава и комбинаций буферных растворов, используемых для конструирования и тестирования, от состава мультимембранного композита.

Практическая значимость работы заключается в выделении и идентификации штаммов *H. pylori*, которые были использованы в ряде научно-исследовательских работ. Полученные штаммы *H. pylori* применили при изучении антибиотикорезистентности микроорганизмов, в результате чего был разработан способ определения чувствительности данного вида микроорганизмов к антибиотикам, основанный на оценке уровня его уреазной активности (патент №2588469 от 27.07.2016 г.); при разработке способа моделирования хеликобактериоза на аутбредных белых мышах (патент № 2690943 от 07.06.2019 г.). Также штаммы *H. pylori* были использованы на

этапах определения чувствительности и специфичности разработанного экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы.

Кроме этого, практическая значимость работы заключается в разработке экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы, предназначенной для выявления белка патогенности CagA *H. pylori* в культуре, выделенной из различного биологического материала (биопсийного материала желудка, кала и содержимого зубодесневых карманов), которая может быть использована для постановки диагноза хеликобактериоз, обоснованного назначения и контроля эрадикационной терапии.

Разработанный экспериментальный образец иммунохроматографической тест-системы используется в образовательном процессе двух университетов: в ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», в Институте биологии и биотехнологии на кафедре микробиологии при проведении лабораторных занятий у студентов по дисциплине «Основы иммунологии и фармакологии» (Справка (акт) о внедрении основных научных результатов диссертации; возможность внедрения рассмотрена на расширенном заседании кафедры микробиологии, протокол № 6 от 07.07.2020); в ФГБОУ ВО «Кировский ГМУ» Минздрава России при обучении студентов педиатрического и лечебного факультета специальностей 30.05.01 «Медицинская биохимия», 31.05.01 «Лечебное дело», 31.05.02 «Педиатрия» по дисциплинам «Общая и клиническая иммунология», «Микробиология, вирусология», «Иммунология» на кафедре микробиологии и вирусологии (Акт внедрения № 1973-01-24 от 24.07.2020 г.). – Учрежденческий уровень внедрения.

Методология и методы исследования. В работе использовали следующие методы исследования: микробиологические, молекулярно-генетические, серологические методы для идентификации *H. pylori*; цитратный метод Френса для синтеза наночастиц коллоидного золота; метод Жигмонди для определения «золотого числа»; иммунохроматографический анализ; статистические методы (Монте-Карло, критерий хи-квадрат (χ^2), расчет коэффициентов τ -b Кендалла и d Сомера).

Основные положения, выносимые на защиту

1. Иммунохроматографическая тест-система для выявления белка CagA *H. pylori*, представляющая собой мультимембранный композит, состоящий из нитроцеллюлозной мембраны, на поверхность которой наклеены мембрана для образца, адсорбирующая мембрана, мембрана с иммобилизованным конъюгатом моноклональных антител НР-387 («Биалекса», Россия) с наночастицами коллоидного золота диаметром 30 нм, и нанесены в поперечном направлении в тестовой зоне моноклональные антитела НР-1811 («Биалекса», Россия), в контрольной зоне – антивидовые антитела кролика против иммуноглобулинов мыши («Биалекса», Россия).

2. Экспериментально доказанное отсутствие статистически значимых различий между результатами выявления CagA⁺ штаммов *H. pylori* молекулярно-генетическим и иммунохроматографическим методами, которое позволяет утверждать о возможности использования иммунохроматографического метода для выявления высокопатогенных штаммов *H. pylori*.

Степень достоверности и апробации результатов исследования.

Достоверность результатов работы подтверждается достаточным количеством экспериментов, использованием современных методов исследования, которые соответствуют поставленным в работе задачам, воспроизводимостью результатов. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, подтверждены статистически достоверными результатами, наглядно представленными на рисунках и в таблицах.

Материалы диссертации представлены и обсуждены на Всероссийской ежегодной научно-практической конференции «Общество, наука, инновации» (Киров, 2015, 2016, 2017 гг.); IX Международном конгрессе «Биотехнологии: состояние и перспективы развития» (Москва, 20-22 февраля 2017 г.); III Всероссийском научном форуме «Наука будущего – наука молодых» (Нижний Новгород, 12-14 сентября 2017 г.).

По результатам работы автор удостоена диплома финалиста конкурса молодых ученых на лучшую научно-исследовательскую работу – г. Москва, 2017 г.; диплома победителя программы «У.М.Н.И.К.» – 2017 г.

Личный вклад автора. Работа выполнена на базе кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет». Исследование проведено при поддержке гранта «УМНИК-2017», тема проекта «Разработка усиленного солями серебра лабораторного образца иммунохроматографической тест-системы для индикации белка CagA *Helicobacter pylori*» (договор № 12812ГУ/2018 от «26» апреля 2018 г.).

Автор лично выполнила весь объем исследований по теме диссертационной работы: планировала работу, проводила теоретические и экспериментальные исследования, а также анализировала полученные результаты, писала статьи, тезисы и заявки на изобретения.

Публикации результатов исследования. По теме диссертации опубликовано 17 научных работ, из них 5 статей в журналах, рекомендованных ВАК для публикации основных результатов исследования, 4 патента на изобретения и 7 докладов в материалах Международных и Всероссийских научных конференций.

Структура и объем диссертации. Диссертация изложена на 137 стр., включает следующие разделы: введение, основная часть, заключение, выводы, рекомендации по использованию результатов работы, список сокращений и условных обозначений, список литературы, в который входит 114 источников, список публикаций автора, приложения. Работа содержит 28 таблиц, 14 рисунков и 5 приложений.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю д.м.н., доценту Н.В. Богачевой за помощь и поддержку в ходе выполнения исследований, руководству университета и директору Института биологии и биотехнологии к.т.н. Е.А. Мартинсон, к.б.н. старшему научному сотруднику А.В. Чернядьеву за возможность оценки результатов исследования на базе центра «Нанотехнологии», а также коллективу кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «ВятГУ».

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

Представлен обзор отечественных и зарубежных публикаций, посвященных анализу морфологических особенностей бактерий *H. pylori*, изучению их антигенного строения и факторов патогенности. Показано многообразие методов диагностики хеликобактериоза, рассмотрены их преимущества и недостатки. Обоснована перспектива использования быстрых высокочувствительных и специфичных экспресс-методов диагностики, среди которых особое место занимает метод иммунохроматографического анализа. Подробно рассмотрена проблема разработки иммунохроматографической тест-системы для выявления белка CagA *H. pylori*, а также основные перспективные направления повышения специфичности и чувствительности иммунохроматографических тест-систем.

МЕТОДОЛОГИЯ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа по созданию экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы для выявления белка патогенности CagA *H. pylori* выполнена на кафедре микробиологии Института биологии и биотехнологии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Вятский государственный университет», г. Киров.

Объекты исследования – штаммы *H. pylori*, выделенные из зубодесневых карманов, кала и биопсийного материала слизистой оболочки желудка, у лиц, имеющих в анамнезе гастрит или язвенную болезнь желудка; штамм *Proteus vulgaris* из коллекции культур кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «ВятГУ»; комплексный антигенный препарат «AGHPY-0100» («Arista Biologicals», США), в состав которого входят внутриклеточные белки *H. pylori*, ассоциированные с генами cagA (120 kd) и vacA (87 kd), уреазы.

Среды и условия культивирования. Культуру *H. pylori* выращивали на селективной питательной среде – колумбийском кровяном агаре с антибиотиками амфотерицином и ванкомицином Б. Посевы инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 3-5 суток (Алешкин *и др.*, 2013).

Идентификация. Анализ выросших колоний *H. pylori* на плотных питательных средах культур проводили на третьи-пятые сутки после посева культуры микроорганизма.

Микробиологическую идентификацию микроорганизмов – методом микроскопии мазков, окрашенных по методу Грама (Теппер *и др.*, 2004; Золотарев *и др.*, 2012).

Биохимическую идентификацию выделенных штаммов осуществляли, используя оксидазный, каталазный и уреазный тесты.

Молекулярно-генетическую идентификацию штаммов проводили с использованием комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК *H. pylori* в режиме реального времени («ДНК-технологии», Россия). Определение генов

патогенности *H. pylori* осуществляли методом ПЦР с использованием коммерческих тест-систем «Хеликопол СА» (на наличие гена *cagA*), «Хеликопол ВА» (*vacA*), «Хеликопол ІА» (*iceA*), «Хеликопол ВА» (*babA*) («Литех», Россия).

Иммунохроматографическую идентификацию выделенных штаммов осуществляли с использованием коммерческих иммунохроматографических тест-систем «РЭД *Helicobacter pylori*» (Россия) и «NovaMed» (Израиль).

Коммерческие наборы и тест-системы. Набор «*H. pylori* тест» («Novamed», Израиль) для выявления антигенов *H. pylori*; тест-систему «РЭД *Helicobacter pylori*» («РЭД», Россия) для выявления антигенов *H. pylori*; набор для выделения ДНК («Литех», Россия); комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК *H. pylori* в режиме реального времени («ДНК-технологии», Россия); тест-системы «Хеликопол СА», «Хеликопол ВА», «Хеликопол ІА», «Хеликопол ВА» для генотипирования выделенных штаммов («Литех», Россия); набор для ДОТ-анализа «Хелико-экспресс» («Вектор-бест», Россия); тест-систему для определения оксидазной активности «OXI test» («Erba LACHEMA», Чехия).

Мембраны. Нитроцеллюлозные мембраны «Hi Flow Plus Membrane Cards 135», («Millipore», США) и «TYPE-CNPF-SN12-L2-P25 10μ» («MDI», Индия); мембраны для нанесения образцов «TYPE-GFB-R4(0.35)» («MDI», Индия); мембраны из стекловолокна для конъюгата «PT-R5» («MDI», Индия), «G041 Glass Fiber Conjugate Pad Strips» («Millipore», США); мембраны для абсорбента «TYPE-AP 045» («MDI», Индия).

Антитела. Мышинные моноклональные антитела к белку *CagA H. pylori* (клоны HP-387 и HP-1811) («Биалекса», Россия); антивидовые антитела кролика против IgG мыши («Биалекса», Россия).

Растворы. 0,025 М сукцинатно-боратный буфер (СББ) с pH 9,0; рабочий буфер – 0,025 М Трис-буфер с pH 9,0; стабилизирующий буфер – 0,025 М Трис-буфер с 1,0 % сахарозой, 0,1 % Tween-20 и 1,0 % БСА, pH 8,5; 4,0 % раствор ПЭГ; 0,1 М раствор карбоната калия; 0,05 М раствор тетрабората натрия; буфер разгона – 0,01 М Трис буфер с 1 М NaCl и 0,1 % Tween 20, pH 7,5; 0,5 М раствор цитратного буфера, pH 4,0.

Синтез наночастиц. Синтез наночастиц коллоидного золота приводили цитратным методом Френса (Frens, 1973) с модификациями (Смирнова и др., патент № 2644466, 2018 г.)

Методика определения «золотого числа». Минимальное количество антител, предотвращающее солевую агрегацию наночастиц коллоидного золота, определяли по методике Жигмонди (Hermanson, 2008).

Статистические методы анализа. Качественные данные представлены в виде абсолютных (N) и относительных величин (P, %) и их 95 % доверительных интервалов (CI95%). Расчет 95 % доверительных интервалов выполнен методом Монте-Карло (проекция на 100000 случайных наблюдений) с помощью программы «WinBUGS 1.4.0». Статистический анализ изучаемых качественных данных выполнен путем построения четырехпольных таблиц сопряжения. Оценка статистической значимости различий выборочных качественных признаков выполнена с помощью критерия хи-квадрат (χ^2) с поправкой на

непрерывность Йетса. В случаях ограничения применения критерия χ^2 использовался точный критерий Фишера. Критическим уровнем статистической значимости различий (p) установлено значение $p < 0,05$. Верификация статистической значимости различий выборочных качественных данных выполнена путем сопоставления их 95 % доверительных интервалов. Оценка корреляционной зависимости (плотности связи) выборочных качественных данных выполнена с помощью симметричного критерия τ -b (tau-b) Кендалла и асимметричного (направленного) критерия d Сомера. Статистический анализ выполнен с применением программных пакетов «Microsoft Office Excel», «Statistica 10.0» и «WinBUGS 1.4.0».

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Выделение и идентификация штаммов *H. pylori*. На первом этапе работы получили культуры *H. pylori*, принадлежность которых к виду подтвердили микробиологическими, биохимическими и молекулярно-генетическими методами.

Данные биохимического и микробиологического этапов идентификации позволили определить принадлежность к виду *H. pylori* 10 штаммов, выделенных из материала зубодесневых карманов и 8 штаммов – из биопсийного материала добровольцев. На этапе молекулярно-генетического анализа принадлежность к *H. pylori* определили у 6 культур, выделенных из зубодесневых карманов, и 6 культур – из биопсийного материала.

Учитывая цель работы, заключающуюся в создании иммунохроматографической тест-системы для выявления высокопатогенных штаммов, продуцирующих белок CagA, на следующем этапе работы провели генотипирование выделенных штаммов. К высокопатогенным штаммам, по данным литературы, относятся бактерии, имеющие генотип $cagA^+vacA^+$, $cagA^+vacA^-$ или $cagA^-vacA^+$ (подтипы – s1, s2; аллели – m1, m2). У низкопатогенных штаммов гены *cagA* и *vacA* отсутствуют, гены *iceA* и *babA* представлены незначительно либо отсутствуют (Файзуллина, 2011).

По результатам генотипирования было установлено, что наиболее высокой патогенностью обладают штаммы, выделенные из проб № 1з (с генотипом $cagA^+vacA^+(s1^-m1^-s2^-m2^+)$), № 5б (с генотипом $cagA^+vacA^+(s1^-m1^-s2^-m2^+)$) и № 11б (с генотипом $cagA^+vacA^+(s1+m1+s2^-m2^-)$); средней патогенностью штаммы, выделенные из проб № 3з (с генотипом $cagA^-vacA^+(s1^+m1^+s2^-m2^+)$), № 4з и № 5з (с генотипом $cagA^-vacA^+(s1^+m1^-s2^-m2^+)$), № 6з и № 11з (с генотипом $cagA^-vacA^+(s1^-m1^+s2^-m2^-)$), № 4б, № 8б, № 10б (с генотипом $cagA^-vacA^+(s1^-m1^+s2^-m2^+)$); низкой патогенностью – из пробы № 3б (с генотипом $cagA^-vacA^+(s1^-m1^-s2^-m2^+)$). Гены *iceA* и *babA* ни у одного из штаммов не обнаружили (Шубёнкина, 2014). Для дальнейшей работы по созданию экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы для детекции белка патогенности CagA *H. pylori* выбрали высокопатогенный $cagA^+$ штамм – № 11б.

2. Анализ основных подходов к созданию иммунохроматографической тест-системы. В результате анализа отечественной и зарубежной литературы, касающейся вопросов разработки тест-

систем, установили, что в качестве маркера оптимальным является применение наночастиц коллоидного золота с диаметром 25-30 нм (Сотников *и др.*, 2015); наибольшую чувствительность тест-системы обеспечивает концентрация антител в конъюгате, на 10,0-20,0 % превышающая «золотое число» (Сафенкова *и др.*, 2013; Бызова *и др.*, 2013); среди наиболее часто используемых буферных растворов как на этапе приготовления конъюгата наночастиц коллоидного золота (НчКЗ) с моноклональными антителами (МкАТ), так и на этапе анализа образцов следует отметить растворы, приготовленные на основе Трис-буфера (Бызова *и др.*, 2013; Петракова *и др.*, 2013); для получения мультимембранного композита иммунохроматографических тест-систем в большинстве проанализированных случаев предпочтение отдается мембранам фирмы «MDI» (Смирнова *и др.*, 2018).

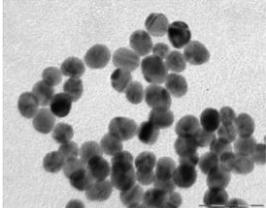
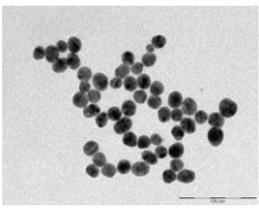
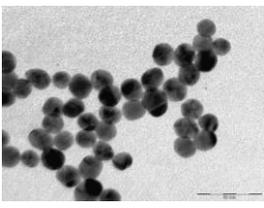
Полученные теоретические знания использовали при разработке экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы для выявления белка *CagA H. pylori*.

3. Синтез наночастиц коллоидного золота. На первом этапе с учетом условий внесения реагентов (золотохлористоводородной кислоты и цитрата натрия), режимов перемешивания и температуры нагревания растворов разработали способ получения препаратов наночастиц коллоидного золота размером 25-30 нм, как основного маркера иммунохроматографических тест-систем (патент на изобретение № 2644466). По разработанной методике получили серии препаратов НчКЗ 23/16, 24/16, 25/16, кондиционность которых оценили по результатам электронной микроскопии и спектрофотометрии (таблица 1).

Таблица 1 – Результаты оценки серий препаратов НчКЗ, подтверждающие воспроизводимость способа получения наночастиц коллоидного золота со средним диаметром 25-30 нм

Показатель	Значения показателя для препарата коллоидного золота серии № ...		
	23/16	24/16	25/16
Цвет коллоидного раствора	Рубиново-красный	Рубиново-красный	Рубиново-красный
Форма частиц (по данным электронной микроскопии)	Частицы круглые с ровными краями, равномерно распределены в поле зрения, не образуют конгломератов, равномерные по электронной плотности	Частицы преимущественно круглой формы, в большей степени равномерные по электронной плотности, без конгломератов	Частицы круглой и овальной формы, неравномерные по электронной плотности, образуют скопления
Однородность по форме и размеру	Однородные	Однородные	Однородные

Продолжение таблицы 1

Показатель	Значения показателя для препарата коллоидного золота серии №		
	23/16	24/16	25/16
Наличие конгломератов	Нет	Нет	Нет
Средний диаметр частиц, нм	30	25	26
Оптическая плотность раствора (ОР):			
– максимум пика поглощения (ед. ОР);	1,379	1,314	1,395
– длина волны максимума пика поглощения, нм;	525-526	523-524	524-525
– средний диаметр НчКЗ, определенный по результатам спектрофотометрии, нм	30	20	25
Фотография препарата НчКЗ			

4. Определение «золотого числа». «Золотое число» – минимальное количество белка, предотвращающее солевую агрегацию наночастиц коллоидного золота (Дыкман *и др.*, 2008). Для его определения использовали синтезированные НчКЗ с диаметром 30 нм и мышинные МкАТ к белку СаgА *H. pylori*, клоны НР-1811 и НР-387 («Биалекса», Россия). По результатам постановки «золотого числа» определили оптимальную концентрацию антител, для клона НР-387 она составила $18,4 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$, для клона НР-1811 – $20,7 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$.

5. Выбор оптимальной комбинации моноклональных антител в конъюгате и в аналитической зоне. Для определения оптимальной комбинации моноклональных антител в конъюгате и в аналитической зоне приготовили два варианта конъюгатов, состоящих из НчКЗ размером 30 нм с МкАТ НР-1811 и с МкАТ НР-387 в выбранной концентрации, и сделали четыре варианта тест-систем: 1-й вариант – МкАТ НР-1811 и в конъюгате, и в аналитической зоне; 2-й вариант – МкАТ НР-387 в конъюгате, МкАТ НР-1811 в аналитической зоне; 3-й вариант – МкАТ НР-1811 в конъюгате, в МкАТ НР-387 аналитической зоне; 4-й вариант – МкАТ НР-387 и в конъюгате, и в аналитической зоне. По результатам исследования оптимальной оказалась комбинация антител во втором варианте (МкАТ НР-387 с НчКЗ в конъюгате и МкАТ НР-1811 в аналитической зоне), которая обеспечила более яркое окрашивание аналитической зоны при тестировании с суспензией культуры *H. pylori*.

6. Сравнительный анализ комбинаций буферных растворов, используемых на различных этапах создания тест-системы. На данном этапе работы было использовано четыре комбинации буферных растворов (таблица 2).

Таблица 2 – Сочетания буферных растворов, используемых при разработке иммунохроматографических тест-систем

Вариант ИХ тест-системы	Характеристика буферного раствора, используемого...		
	в качестве буфера для разведения АТ	для отмывки конъюгата от несвязавшихся антител	для анализа тест-системы
1	0,025 М ФСБ, рН 9,0	0,025 М Трис-буфер с 10,0 % сахарозой и 0,02 % БСА, рН 8,5	0,01 М Трис-буфер с 1 М NaCl и 0,1 % Tween 20, рН 7,5
2	0,025 М СББ, рН 9,0	0,025 М Трис-буфер с 10,0 % сахарозой и 0,02 % БСА, рН 8,5	0,01 М Трис-буфер с 1 М NaCl и 0,1 % Tween 20, рН 7,5
3	0,025 М Трис-буфер, рН 9,0	0,025 М Трис-буфер с 10,0 % сахарозой и 0,02 % БСА, рН 8,5	0,01 М Трис-буфер с 1 М NaCl и 0,1 % Tween 20, рН 7,5
4	0,025 М Трис-буфер, рН 9,0	0,025 М Трис-буфер с 1,0 % сахарозой, с 1,0 % БСА, 0,1 % Tween 20, рН 8,5	0,01 М Трис-буфер с 1 М NaCl и 0,1 % Tween 20, рН 7,5

Сравнительный анализ четырех вариантов комбинаций буферных растворов позволил выбрать наиболее рациональную из них: 0,025 М Трис-буфер с рН 9,0 в качестве буфера для разведения МкАТ (рабочего буфера); 0,025 М Трис-буфер с 1,0 % сахарозой и 0,02 % БСА, рН 8,5 – для их отмывки от несвязавшихся антител на этапе приготовления конъюгата (стабилизирующий буфер); 0,01 М Трис-буфер с 1 М NaCl и 0,01 % Tween 20, рН 7,5 – применяемый в качестве буфера разгона тестируемого материала на экспериментальных образцах тест-систем.

7. Определение состава мультимембранного композита. Доказано, что качество и физические свойства компонентов мультимембранного комплекса определяют равномерность, скорость перемещения иммунохимических компонентов, что в свою очередь существенно сказывается на интенсивности окраски зон специфического связывания иммунокомпонентов и чувствительности анализа (Урусов *и др.*, 2012). В связи с этим в работе провели сравнение мембран двух фирм производителей: «Millipore» (США) и «MDI» (Индия). Оценили как рабочие мембраны «HF-135» («Millipore») и «CNPF 10μ» («MDI»), так и мембраны для нанесения конъюгата – «G041 Glass Fiber Conjugate Pad Strips» («Millipore», США) и «PT-R5» («MDI», Индия). Результаты исследования показали, что более качественный результат анализа обеспечивают мембраны фирмы «MDI» с указанными выше характеристиками.

8. Методика создания иммунохроматографической тест-системы для индикации белка CagA *H. pylori*. Поэтапно методику изготовления разработанного экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы для выявления антигена CagA *H. pylori* можно представить следующим образом (Смирнова *и др.* Патент на изобретение № 2642588, 2018 г):

1. Синтез кондиционных препаратов НчКЗ с диаметром частиц 25-30 нм. К 49,23 см³ деионизированной воды добавляли 0,058 см³ 10,0 % раствора золотохлористоводородной кислоты, доводили до кипения и при перемешивании вносили 0,72 см³ 1,0 % раствора 5,5-водного цитрата натрия. Смесь кипятили 20 мин, затем охлаждали и хранили при 4 °С. Размеры, дисперсионные свойства, электронную плотность частиц анализировали на электронном трансмиссионном микроскопе (Смирнова *и др.* Патент на изобретение № 2644466, 2018 г.).

2. Получение конъюгата МкАТ и НчКЗ. МкАТ НР-387 («Биалекса», Россия), разведенные на 0,025 М Трис-буфере, смешивали с равным объемом НчКЗ, получая конечную концентрацию МкАТ, определенную при постановке «золотого числа». Конъюгат инкубировали 30 мин при комнатной температуре, периодически перемешивая на вортексе («Biosan», Латвия). Для стабилизации добавляли профильтрованный 4,0 % раствор ПЭГ и инкубировали 15 мин. Конъюгат центрифугировали на центрифуге «Centrifuge 5415 R» («Eppendorf», Германия), используя ускорение 13400 об·мин⁻¹ в течение 30 мин при 4 °С. Супернатант удаляли, осадок ресуспендировали в стабилизирующем буфере, приготовленном на основе 0,025 М Трис-буфер, содержащем 1,0 % БСА, 1,0 % сахарозу и 0,1 % Tween 20. Процедуру отмывки конъюгата от несвязавшихся антител проводили дважды. После второго центрифугирования удаляли надосадочную жидкость, полученный осадок ресуспендировали в стабилизирующем буфере, концентрируя конъюгат в четыре раза.

Раствор конъюгата методом пропитывания наносили на мембрану для конъюгата «PT-R5» («MDI», Индия) с плотностью нанесения 30 мкл на 1 см² и высушить на воздухе при комнатной температуре в течение 24 ч.

3. Формирование иммунохроматографического композита. Склеивание тест-систем проводили последовательно: на нитроцеллюлозную мембрану «TYPE-CNPF-SN12-L2-P25», 10μ («MDI», Индия) наклеивали мембрану с иммобилизованным конъюгатом, мембрану для образца «TYPE-GFB-R4» (0.35) («MDI», Индия) и мембрану для адсорбента «TYPE-AP 045» («MDI», Индия). Затем полученный мультимембранный композит нарезали при помощи резака («Rahmenlos® Katze Geschenk Shirt», США) на отдельные полоски шириной 3,5-4,0 мм.

4. Нанесение на нитроцеллюлозную мембрану тестовой (аналитической) и контрольной зон тест-системы. Для формирования аналитической зоны тест-системы наносили с помощью дозатора 0,5 мкл МкАТ НР-1811 («Биалекса», Россия) в концентрации 12 мг·см⁻³ на рабочую мембрану, для формирования контрольной зоны наносили 0,5 мкл антивидовых антител («Биалекса», Россия) в концентрации 10 мг·см⁻³. Готовые тест-системы высушивали при комнатной температуре в течение суток.

9. Состав полученного экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы. В результате работы создали экспериментальный образец иммунохроматографической тест-системы, состоящий из нитроцеллюлозной мембраны «TYPE-CNPF-SN12-L2-P25» 10μ («MDI», Индия), на поверхность которой наклеены мембрана для конъюгата

«PT-R5» («MDI», Индия), мембрана для образца «TYPE-GFB-R4(0.35)» («MDI», Индия) и адсорбирующая мембрана «TYPE-AP 045» («MDI», Индия). На мембрану «PT-R5» нанесен конъюгат МкАТ, клон НР-387 («Биалекса», Россия), с наночастицами коллоидного золота со средним диаметром 30 нм, а на нитроцеллюлозную мембрану нанесены МкАТ, клон НР-1811 («Биалекса», Россия) в концентрации $12 \text{ мг} \cdot \text{см}^{-3}$ и антивидовые антитела к Ig мыши («Биалекса», Россия) в концентрации $10 \text{ мг} \cdot \text{см}^{-3}$ для формирования тестовой и контрольной зон тест-системы, соответственно. Внешний вид экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы представлен на рисунке 1.

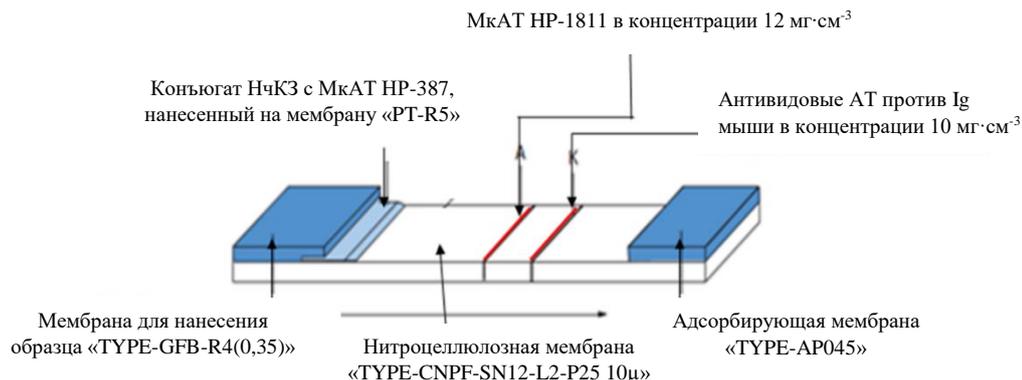


Рисунок 1 – Внешний вид и основные компоненты разработанного экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы для диагностики хеликобактериоза

10. Тестирование экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы. С целью оценки специфичности и чувствительности изготовленного экспериментального образца тест-системы провели тестирования с *sagA*⁺ штаммом *H. pylori* 11б. Порог чувствительности составил $2,5 \cdot 10^9 \text{ м.к.} \cdot \text{см}^{-3}$. Специфичность тест-системы исследовали при тестировании буфера разгона (0,01 М Трис-буфер с 1 М NaCl и 0,1 % Tween 20, рН 7,5) и с культурой *P. vulgaris* и *sagA*-негативными штаммами *H. pylori*, результат оказался отрицательным.

В связи с тем, что целевой антиген (белок CagA) расположен внутриклеточно, а не является поверхностным антигеном целого корпускулярного микроорганизма, об истинной оценке чувствительности тест-системы можно говорить только при тестировании ее с коммерческим CagA антигеном или с антигеном, предварительно выделенным из биологического материала, полученного от пациентов. При тестировании экспериментального образца с коммерческим антигеном «AGHPY-0100» («Arista Biologicals», США), в состав которого входят внутриклеточные белки *H. pylori*, ассоциированные с генами *sagA* (120 kd) и *vacA* (87 kd), и уреазы, порог чувствительности составил $0,5 \text{ мг} \cdot \text{см}^{-3}$.

11. Разработка методики повышения чувствительности иммунохроматографической тест-системы. С целью повышения чувствительности созданного экспериментального образца рассмотрели

возможность применения лактата серебра и гидрохинона (Бызова *и др.*, 2015).
Для этого:

1. Обработывали 0,075 % раствором лактатом серебра нитроцеллюлозную мембрану сушили в темноте при комнатной температуре в течение суток.

2. Собирали мультимембранный композит тест-системы, наносили моноклональные антитела в аналитическую и контрольную зоны, сушили при комнатной температуре в течение суток.

3. Для тестирования наносили 100 мкл пробы на мембрану для образца. По истечении 10 мин накладывали на область аналитической и контрольной зон мембрану «РТ-R5», пропитанную 3,0 % гидрохиноном.

4. На наложенную мембрану «РТ-R5» с гидрохиноном наносили 30 мкл буфера разгона, выдержали 5 мин и убирали мембрану. Результаты определяли визуально в течение 20-25 мин.

По результатам оценки разработанной методики удалось понизить порог чувствительности иммунохроматографической тест-системы в 4 раза как при тестировании культуры *H. pylori* (с $2,5 \cdot 10^9$ м.к.·см⁻³ до $6,25 \cdot 10^8$ м.к.·см⁻³), так и при тестировании антигена «AGHPY-0100» (с 0,5 мг·см⁻³ до 0,125 мг·см⁻³), результаты представлены в таблицах 3 и 4.

Таким образом, в результате работы на основе иммунохимических компонентов отечественного производства создан экспериментальный образец иммунохроматографической тест-системы, предназначенный для выявления патогенного белка CagA *H. pylori* в различном биологическом материале, не имеющий аналогов на Российском рынке.

Таблица 3 – Оценка влияния лактата серебра на чувствительность экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы при тестировании с культурой *H. pylori*

	Культура <i>H.pylori</i> в концентрации..., м.к.·см ⁻³						
	контроль	10,00·10 ⁹	5,00·10 ⁹	2,50·10 ⁹	1,25·10 ⁹	0,62·10 ⁹	0,31·10 ⁹
Не модифицированная тест-система							

Продолжение таблицы 3

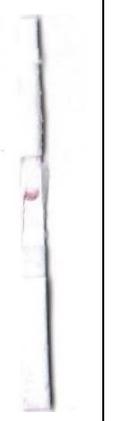
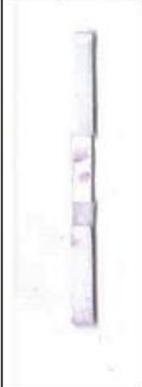
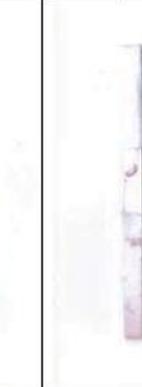
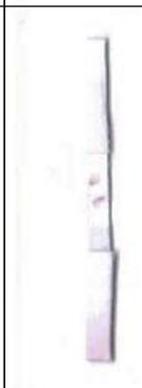
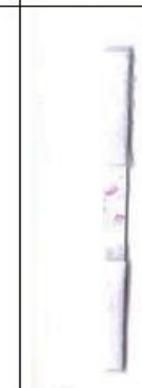
	Культура <i>H.pylori</i> в концентрации..., м.к.·см ⁻³						
	контроль	10,00·10 ⁹	5,00·10 ⁹	2,50·10 ⁹	1,25·10 ⁹	0,62·10 ⁹	0,31·10 ⁹
Тест-система, усиленная лактатом серебра							

Таблица 4 – Оценка влияния лактата серебра на чувствительность экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы при тестировании с антигеном «AGHPY-0100»

	Контроль	Антиген AGHPY-0100 в концентрации..., мг·см ⁻³			
		0,500	0,250	0,125	0,062
Не модифицированная тест-система					
Тест-система, усиленная лактатом серебра					

12. Сравнение результатов выявления *SagA*-положительных штаммов *H. pylori* иммунохроматографическим и молекулярно-генетическим методами. На следующем этапе провели тестирование разработанного образца иммунохроматографической тест-системы с различным биологическим материалом добровольцев, в анамнезе которых был гастрит или язвенная болезнь желудка. Одним из условий отбора пациентов для тестирования было отсутствие назначения им антихеликобактерной терапии. Все добровольцы, участвующие в

исследовании, дали информированное согласие на обследование. Работу проводили в соответствии с биомедицинской этикой согласно требованиям Женевской конвенции о правах человека (1997 г.) и Хельсинкской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000 г.).

Предварительно сыворотки крови добровольцев протестировали на наличие антител к белку *CagA* *H. pylori* с помощью коммерческого набора для ДОТ-анализа «Хелико-экспресс» («ВЕКТОР-БЕСТ», Россия). Из 50 серопозитивных добровольцев отобрали 40 человек, у которых выделение чистой культуры *H. pylori* было проведено из трех видов взятого у добровольцев биологического материала (биопсийного материала слизистой оболочки желудка, кала и содержимого зубодесневых карманов).

По результатам исследования установили, что *H. pylori* была выявлена у серопозитивных добровольцев, не принимавших раньше антихеликобактерную терапию, бактериологическим методом в биопсийном материале слизистой желудка в 90 % случаев, в кале – в 35,0 %, в материале из зубодесневых карманов – в 52,5 % случаев. Выделенные культуры протестировали на предмет наличия патогенного белка *CagA* молекулярно-генетическим методом.

Среди пациентов данной группы молекулярно-генетическим методом ген *cagA* был выявлен, соответственно, в 25,0 %, в 26,7 % и в 34,8 % случаев (рисунок 2).

Результаты иммунохроматографического анализа с использованием разработанного экспериментального образца показали наличие белка *CagA* при тестировании культур, выделенных из биопсийного материала в 19,4 % случаев, кала и материала зубодесневых карманов, соответственно, в 20,0 % и 13,0 % случаев (рисунок 2), именно эта часть пациентов особо нуждается в назначении антихеликобактерной терапии, поскольку их хеликобактериоз вызван высокопатогенными *CagA*-положительными штаммами *H. pylori*.

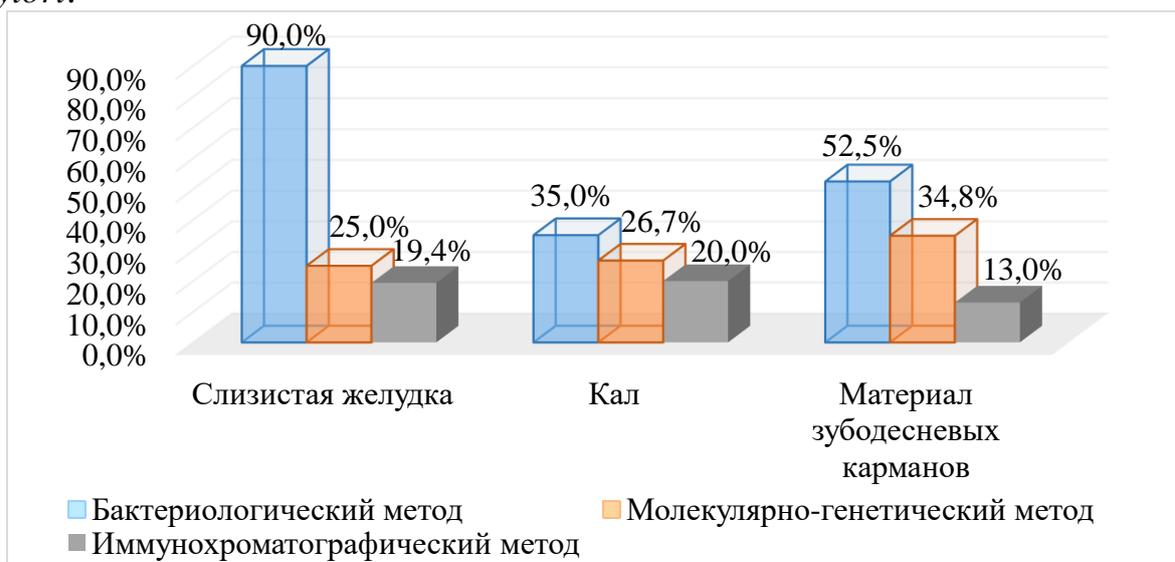


Рисунок 2 – Сравнительный анализ выявления чистой культуры *H. pylori* бактериологическим методом, гена *cagA* молекулярно-генетическим и белка *CagA* иммунохроматографическими методами в зависимости от вида исследуемого материала

В таблице 5 представлена частота положительных результатов взаимодействия между молекулярно-генетическим и иммунохроматографическим методами по выявлению CagA⁺ штаммов *H. pylori* в материале, выделенном из слизистой оболочки желудка.

Таблица 5 – Положительные результаты молекулярно-генетического и иммунохроматографического анализа на выявление CagA⁺ штаммов *H. pylori*

Молекулярно-генетический анализ		Иммунохроматографический анализ		χ^2	p*
N	P, %	N	P, %		
9	25,0	7	19,4	0,08	0,78

Примечания:

1. N – количество выделенных CagA⁺ штаммов.
2. P – частота встречаемости положительных результатов выявления CagA⁺ штаммов.
3. χ^2 – критерий хи-квадрат Пирсона.
4. p – уровень статистической значимости между результатами выявления CagA⁺ штаммов *H. pylori* молекулярно-генетическим и иммунохроматографическим методами.
5. «*» – критическим уровнем статистической значимости различий (p) установлено значение $p < 0,05$.

Данные, представленные в таблице, свидетельствуют об отсутствии статистически значимого различия по частоте выявления CagA⁺ штаммов в исследованных выборках при тестировании молекулярно-генетическим и иммунохроматографическим методом.

Результат оценки статистической значимости различия между данными молекулярно-генетического и иммунохроматографического анализа верифицируется сопоставлением 95 % доверительных интервалов частот положительных случаев выявления CagA⁺ штаммов *H. pylori* с помощью обоих методов (таблица 6).

Таблица 6 – Сравнение 95 % доверительных интервалов частот положительных результатов выявления CagA⁺ штаммов *H. pylori*

Сравнение 95 % доверительных интервалов частот положительных результатов выявления CagA ⁺ штаммов <i>H. pylori</i> при использовании		p*
молекулярно-генетического анализа	иммунохроматографического анализа	
P, % (CI95%)	P, % (CI95%)	
13,88 – 41,23	9,91 – 35,09	>0,05

Примечания:

1. P – частота встречаемости положительных результатов выявления CagA⁺ штаммов.
2. CI95% – 95 % доверительный интервал.
3. p – уровень статистической значимости между результатами выявления CagA⁺ штаммов *H. pylori* молекулярно-генетическим и иммунохроматографическим методами.
4. «*» – критическим уровнем статистической значимости различий (p) установлено значение $p < 0,05$.

Из данных, представленных в таблице 6, видно, что наблюдается перекрывание 95 % доверительных интервалов частот случаев выявления гена *cagA* молекулярно-генетическим и белка CagA иммунохроматографическим

методами, что подтверждает отсутствие статистически значимого различия между результатами этих видов анализа.

Кроме этого, нами была проведена оценка диагностической значимости иммунохроматографического анализа при исследовании сопоставимости результатов выявления гена *cagA* и белка CagA молекулярно-генетическим и иммунохроматографическим методом, соответственно. В таблице 7 представлена количественная оценка плотности связи между результатами выявления CagA⁺ штаммов *H. pylori* методами молекулярно-генетического и иммунохроматографического анализа.

Таблица 7 – Оценка плотности связи между результатами выявления CagA⁺ штаммов *H. pylori*, полученными молекулярно-генетическим и иммунохроматографическим методами

Статистический критерий	Оценка плотности связи между результатами выявления CagA ⁺ штаммов <i>H. pylori</i> при использовании	
	молекулярно-генетического анализа	иммунохроматографического анализа
τ-b Кендалла	0,85*	
d Сомера	0,93*	0,77*
Примечание – «*» – значение критериев входит в диапазон от 0,70 до 1,00, что свидетельствует о высокой плотности связи между методами		

Согласно критериям τ-b Кендалла и d Сомера, между результатами молекулярно-генетического анализа и данными, полученными при использовании разработанного экспериментального образца, в основе которого заложен иммунохроматографический анализ, существует прямая, сильная связь (корреляционная зависимость). По результатам молекулярно-генетического анализа можно с высокой долей вероятности прогнозировать результат выявления CagA⁺ штаммов *H. pylori*, полученный с помощью иммунохроматографического анализа, и наоборот.

Таким образом, отсутствие статистически значимого различия и наличие прямой сильной корреляционной связи между данными молекулярно-генетического и иммунохроматографического анализа, свидетельствуют о том, что эти методы позволяют получить близкие по значимости результаты при идентификации высокопатогенных штаммов *H. pylori*.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В процессе выполнения работы последовательно были выделены и идентифицированы штаммы *H. pylori* при помощи бактериологического, молекулярно-генетического и иммунохроматографического методов. Для дальнейшей работы по созданию экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы для детекции белка патогенности CagA *H. pylori* был выбран высокопатогенный *cagA*⁺ штамм – № 116.

Далее проанализировали основные подходы к созданию иммунохроматографических тест-систем. Полученные теоретические знания использовали при разработке экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы для выявления белка CagA *H. pylori*.

На первом этапе работы с использованием пошаговой методики синтезировали наночастицы коллоидного золота 25-30 нм, которые применили в качестве маркера для получения конъюгата с моноклональными антителами.

Путем постановки «золотого числа» определили концентрацию антител НР-387 и НР-1811, необходимую для защиты коллоидного золота от солевой агрегации при приготовлении конъюгата, которая составила, соответственно, $18,4 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$ и $20,7 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$.

Выбор оптимальной комбинации моноклональных антител в конъюгате и в тестовой зоне позволил определить следующее сочетание – МкАТ НР-387 в конъюгате с НчКЗ и МкАТ НР-1811 в аналитической зоне.

На основании сравнительного анализа четырех вариантов комбинаций буферных растворов выбрали наиболее рациональную из них: 0,025 М Трис-буфер с рН 9,0 в качестве буфера для разведения МкАТ (рабочего буфера); 0,025 М Трис-буфер с 1,0 % сахарозой и 0,02 % БСА, рН 8,5 – в качестве стабилизирующего буфера, используемого для отмывки от несвязавшихся антител на этапе приготовления конъюгата с НчКЗ; 0,01 М Трис-буфер с 1 М NaCl и 0,01 % Tween 20, рН 7,5 – в качестве буфера разгона при тестировании.

Определение состава мультимембранного композита показало, что более качественный результат анализа обеспечивают мембраны фирмы «MDI» – мембрана для нанесения конъюгата «РТ-R5» и нитроцеллюлозная мембрана «TYPE-CNPF-SN12-L2-P25» 10μ.

При тестировании разработанного образца тест-системы со штаммом *H. pylori* 11б определили, что порог чувствительности тест-системы составил $2,5 \cdot 10^9 \text{ м.к.} \cdot \text{см}^{-3}$. С целью повышения чувствительности тест-системы разработали методику усиления тест-системы с использованием лактата серебра и гидрохинона, позволяющую снизить порог детекции в 4 раза как при тестировании культуры *H. pylori* (с $2,5 \cdot 10^9 \text{ м.к.} \cdot \text{см}^{-3}$ до $6,25 \cdot 10^8 \text{ м.к.} \cdot \text{см}^{-3}$), так и при тестировании антигена «AGHPY-0100» (с $0,5 \text{ мг} \cdot \text{см}^{-3}$ до $0,125 \text{ мг} \cdot \text{см}^{-3}$).

Сравнение результатов выявления CagA-положительных штаммов *H. pylori* иммунохроматографическим и молекулярно-генетическим методами показало, что статистически значимое различие по частоте выявления белка CagA у исследуемых выборок добровольцев при тестировании патогена указанными методами отсутствует. Согласно критериям τ -b Кендалла и d Сомера, между результатами молекулярно-генетического анализа и данными, полученными при использовании разработанного экспериментального образца, существует прямая, сильная корреляционная зависимость. По результатам молекулярно-генетического анализа можно с высокой долей вероятности прогнозировать результат выявления CagA⁺ штаммов *H. pylori*, полученный с помощью иммунохроматографического анализа, и наоборот.

Таким образом, поэтапно в результате работы на основе иммунохимических компонентов отечественного производства был создан экспериментальный образец иммунохроматографической тест-системы, предназначенный для выявления патогенного белка CagA *H. pylori*, не имеющий аналогов на Российском рынке.

ВЫВОДЫ

1. Выделены и идентифицированы CagA⁺ штаммы *H. pylori* из биологического материала лиц с хроническими заболеваниями желудка и двенадцатиперстной кишки.
2. Разработан способ получения кондиционного препарата коллоидного золота с размером наночастиц 25-30 нм.
3. Создан экспериментальный образец иммунохроматографической тест-системы, предназначенный для выявления CagA⁺ штаммов *H. pylori* в различном биологическом материале, представляющий собой

мультимембранный композит, состоящий из нитроцеллюлозной мембраны, на поверхность которой наклеены мембрана для образца; адсорбирующая мембрана; мембрана с иммобилизованным конъюгатом моноклональных антител, клон НР-387 («Биалекса», Россия), с наночастицами коллоидного золота со средним диаметром 30 нм, и нанесены в поперечном направлении в тестовой зоне моноклональные антитела, клон НР-1811 («Биалекса», Россия), в контрольной зоне – антивидовые антитела кролика против иммуноглобулинов мыши («Биалекса», Россия).

4. Разработана методика повышения чувствительности иммунохроматографической тест-системы с применением лактата серебра и гидрохинона, позволяющая снизить порог детекции белка CagA в четыре раза как при тестировании с самим микроорганизмом (с $2,5 \cdot 10^9$ м.к.·см⁻³ до $6,25 \cdot 10^8$ м.к.·см⁻³), так и при тестировании с коммерческим антигеном (с $0,5$ мг·см⁻³ до $0,125$ мг·см⁻³).

5. Сравнительный анализ выявления CagA⁺ штаммов *H. pylori* методом иммунохимического анализа и молекулярно-генетическим методом показал отсутствие статистически значимых различий, что позволяет утверждать о возможности диагностического скрининга патогенных штаммов *H. pylori* с использованием разработанного экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы.

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ РАБОТЫ

1. Рекомендовать разработанный экспериментальный образец иммунохроматографической тест-системы для выявления белка CagA *H. pylori* к проведению клинических испытаний.

2. Рекомендовать применение пошаговой методики получения препарата коллоидного золота с размером частиц 25-30 нм для использования в научно-исследовательских целях.

3. Для повышения чувствительности иммунохроматографических тест-систем, предназначенных для детекции как инфекционных, так и неинфекционных антигенов, рекомендовать использование методики усиления иммунохроматографической тест-системы лактатом серебра и гидрохиноном.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

В изданиях, рекомендованных ВАК:

1. **Смирнова, Д.Н.** Сравнительная оценка компонентов иммунохроматографических тест-систем, используемых для их разработки / **Д.Н. Смирнова, К.А. Крупина, Н.В. Богачёва, И.В. Дармов** // Клиническая лабораторная диагностика. – 2017. – Т. 62. – № 1. – С. 30–34. РИНЦ, ИФ=0,528, Scopus. Количество цитирований: 2.

2. **Смирнова, Д.Н.** Разработка экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы для выявления белка патогенности CagA *Helicobacter pylori* // **Д.Н. Смирнова, Н.В. Богачёва, И.В. Дармов** // Клиническая лабораторная диагностика. – 2018. – Т. 63. – № 4. – С. 242–246. РИНЦ, ИФ=0,528, Scopus. Количество цитирований: 1.

3. Богачёва, Н.В. Использование нанотехнологий для разработки иммунохроматографической тест-системы, предназначенной для скрининга *H. pylori*-ассоциированных заболеваний / Н.В. Богачёва, Д.Н. Смирнова, Е.П. Колеватых // Медицинский альманах. – 2018. – № 4. – С. 109–114. РИНЦ, ИФ=0,474.

4. Чичерин, И.Ю. Экспериментальный хеликобактериоз у конвенциональных белых мышей при инфицировании возбудителем *Helicobacter pylori* / И.Ю. Чичерин, И.П. Погорельский, И.А. Лундовских, А.С. Горшков, М.Р. Шабалина, Д.Н. Смирнова, Н.В. Богачёва // Инфекционные болезни. – 2018. – Т. 16. – № 2. – С. 77–85. РИНЦ, ИФ=0,680, Scopus. Количество цитирований: 2.

5. Смирнова, Д.Н. Обоснование чувствительности иммунохроматографического анализа в зависимости от локализации детектируемого антигена / Д.Н. Смирнова, Н.В. Богачёва // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2019. – № 3. – С. 309–313. РИНЦ, ИФ=0,113.

Патенты на изобретения:

1. Пат. 2588469 Российская Федерация, МПК С12Q 1/00, С12Q 1/04, С12Q 1/18, С12N 1/20, G01N 33/48, G01N 33/569. Способ определения чувствительности *H. pylori* к антибиотикам / Н.В. Богачёва, Д.Н. Смирнова, И.В. Дармов ; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Вятский государственный университет". – № 2015118121/10 ; заявл. 14.05.2015 ; опубл. 27.06.2016, Бюл. № 18. Количество цитирований: 1.

2. Пат. 2642588 Российская Федерация, МПК G01N 33/543, G01N 33/577. Иммунохроматографическая тест-система для выявления патогенных штаммов *Helicobacter pylori* / Н.В. Богачёва, И.В. Дармов, Д.Н. Смирнова ; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Вятский государственный университет". – № 2017108557 ; заявл. 14.03.2017 ; опубл. 25.01.2018, Бюл. № 3.

3. Пат. 2644466 Российская Федерация, МПК В01J 13/00, С01G 7/00, В82В 3/00, В82У 30/00, В22F 9/24. Способ получения наночастиц коллоидного золота со средним диаметром 25-30 нм / Н.В. Богачёва, Д.Н. Смирнова, К.А. Крупина, И.В. Дармов ; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Вятский государственный университет". – № 2016130632 ; заявл. 25.07.2016 ; опубл. 30.01.2018, Бюл. № 4.

4. Пат. 2690943 Российская Федерация, МПК G09В 23/28. Способ моделирования хеликобактериоза / И.П. Погорельский, И.Ю. Чичерин, И.А. Лундовских, Д.Н. Смирнова, Н.В. Богачёва ; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Вятский государственный университет". – № 2018117831 ; заявл. 14.05.2018 ; опубл. 07.06.2019, Бюл. № 16.

В сборниках трудов конференций:

1. **Смирнова, Д.Н.** Актуальность изучения антибиотикорезистентности *H. pylori* / **Д.Н. Смирнова**, Н.В. Богачёва // Общество, наука, инновации. НПК – 2015: Всероссийская ежегодная научно-практическая конференция: 13-24 апреля 2015 г., г. Киров / ВятГУ. – Киров, 2015. – С. 154–156. РИНЦ. Количество цитирований: 1.

2. **Смирнова, Д.Н.** Экспериментальное определение минимальной подавляющей концентрации (МПК) изолятов *H. pylori* в жидких питательных средах / **Д.Н. Смирнова**, Н.В. Богачёва // Общество, наука, инновации. НПК – 2015: Всероссийская ежегодная научно-практическая конференция: 13-24 апреля 2015 г., г. Киров // ВятГУ. – Киров, 2015. – С. 157–161. РИНЦ.

3. Крупина, К.А. Разработка методики получения коллоидного золота с размером наночастиц 30 нм / К.А. Крупина, **Д.Н. Смирнова**, Н.В. Богачёва, И.В. Дармов // Общество, наука, инновации. НПК – 2016: сборник статей: Всероссийская ежегодная научно-практическая конференция 18-29 апреля 2016 г., г. Киров. / ВятГУ. – Киров, 2016. – С. 246–252. РИНЦ. Количество цитирований: 1.

4. **Смирнова, Д.Н.** Анализ выбора компонентов, применяемых для разработки иммунохроматографических тест-систем / **Д.Н. Смирнова**, К.А. Крупина, Н.В. Богачёва, И.В. Дармов // Общество, наука, инновации. НПК – 2016: сборник статей: Всероссийская ежегодная научно-практическая конференция 18-29 апреля 2016 г., г. Киров / ВятГУ. – Киров, 2016. – С. 258–264. РИНЦ.

5. **Смирнова, Д.Н.** Разработка алгоритма создания иммунохроматографической тест-системы для выявления белка CagA *H. pylori* / **Д.Н. Смирнова**, Н.В. Богачёва, И.В. Дармов // Общество, наука, инновации. НПК – 2017: сборник статей: всероссийская ежегодная научно-практическая конференция: 1-29 апреля 2017 г., г. Киров / ВятГУ. – Киров, 2017. – С. 176–183. РИНЦ.

6. **Смирнова, Д.Н.** Иммунохроматографическая тест-система для выявления *Helicobacter pylori* / **Д.Н. Смирнова**, Н.В. Богачёва, И.В. Дармов // «Биотехнология: состояние и перспективы развития»: IX Международный конгресс 20-22 февраля 2017 г., г. Москва. – Москва, 2017. – Т.2. – С. 548–550. РИНЦ.

7. **Смирнова, Д.Н.** Применение нанотехнологий для разработки иммунохроматографической тест-системы, предназначенной для диагностики хеликобактериоза // «Наука будущего - наука молодых»: сборник тезисов участников форума: III Всероссийский научный форум; 12.09.2017 – 14.09.2017, г. Нижний Новгород – Москва, 2017. – С. 278–281. РИНЦ.

В других изданиях:

1. **Смирнова, Д.Н.** Разработка способа определения чувствительности *H. pylori* к антибиотикам с помощью уреазного теста в планшетах / **Д.Н. Смирнова**, Н.В. Богачёва, И.В. Дармов // Научный фонд «Биолог» Ежемесячный научный журнал. – 2015. – № 9(13). – С. 18–22.