

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«ВЯТСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

На правах рукописи

СМИРНОВА ДАРЬЯ НИКОЛАЕВНА

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

03.02.03 Микробиология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
доктор медицинских наук, доцент
Богачёва Наталья Викторовна

Киров – 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	6
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	15
1.1 <i>Helicobacter pylori</i> как этиологический агент заболеваний желудочно-кишечного тракта	15
1.2 Микробиологическая характеристика <i>Helicobacter pylori</i>	16
1.3 Факторы патогенности <i>Helicobacter pylori</i> , способствующие развитию заболеваний желудочно-кишечного тракта.....	18
1.4 Методы диагностики хеликобактериоза.....	21
1.5 Основные компоненты иммунохроматографических тест- систем.....	26
1.6 Пути повышения специфичности и чувствительности иммунохроматографических тест-систем	27
1.6.1 Выбор оптимального размера наночастиц коллоидного золота	27
1.6.2 Использование приемов усиления оптического сигнала в тестовой зоне тест-системы.....	30
1.6.3 Определение концентраций специфических иммунохимических компонентов.....	32
1.6.4 Выбор состава и комбинаций буферных растворов.....	33
1.6.5 Определение состава мультимембранного композита.....	38
1.7 Актуальность разработки иммунохроматографической тест-системы для выявления <i>Helicobacter pylori</i>	39
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ	43
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ, ОБОРУДОВАНИЕ, МЕТОДЫ	43
2.1 Материал.....	43
2.1.1 Биологический материал для исследования.....	43
2.1.2 Материал для разработки иммунохроматографической тест-системы.....	43
2.2 Реактивы.....	44
2.3 Питательные среды	44
2.4 Тест-системы	45
2.5 Лабораторная посуда	45

2.6	Оборудование	46
2.7	Методы	47
2.7.1	Приготовление растворов.....	47
2.7.2	Приготовление питательной среды.....	48
2.7.3	Забор и подготовка биологического материала к посеву	49
2.7.4	Микробиологические методы	49
2.7.5	Молекулярно-генетическая идентификация	51
2.7.6	Методика тестирования сыворотки крови на наличие антител к белку CagA <i>Helicobacter pylori</i>	55
2.7.7	Статистические методы	56
ГЛАВА 3. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ШТАММОВ <i>Helicobacter pylori</i>		58
3.1	Выделение культур <i>Helicobacter pylori</i> из биологического материала добровольцев	58
3.2	Идентификация штаммов <i>Helicobacter pylori</i>	59
3.2.1	Микробиологическая идентификация	59
3.2.2	Молекулярно-генетическая идентификация штаммов <i>Helicobacter pylori</i> ..	61
3.2.3	Идентификация штаммов <i>Helicobacter pylori</i> с использованием иммунохроматографического анализа.....	65
ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОБРАЗЦА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БЕЛКА CagA <i>Helicobacter pylori</i>		67
4.1	Получение наночастиц коллоидного золота	67
4.2	Выбор оптимальной концентраций антител для сорбции на наночастицах коллоидного золота.....	72
4.3	Выбор оптимальной комбинации моноклональных антител в конъюгате и в тестовой зоне	74
4.4	Сравнительный анализ комбинаций буферных растворов, используемых на различных этапах создания тест-системы	76

4.5	Определение оптимальной концентрации моноклональных антител в тестовой зоне	78
4.6	Определение зависимости качества иммунохроматографической тест-системы от вариантов использования мембран в мультимембранном композите	79
4.7	Характеристика созданного экспериментального образца тест-системы для выявления белка <i>CagA Helicobacter pylori</i>	80
ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ВЫСОКОПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ <i>H. pylori</i>.....		
5.1	Оценка специфичности и чувствительности экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы.....	83
5.2.	Оценка возможности использования лактата серебра для повышения чувствительности иммунохроматографической тест-системы.....	85
5.3	Скрининг пациентов на наличие хеликобактериоза для отбора в тестирование разработанного образца иммунохроматографической тест- системы.....	92
5.4	Сравнительный анализ выделения чистой культуры <i>H. pylori</i> бактериологическим методом, выявления гена <i>cagA</i> молекулярно-генетическим методом и белка <i>CagA</i> иммунохроматографическим методом.....	94
ЗАКЛЮЧЕНИЕ		98
ВЫВОДЫ		106
РЕКОМЕНДАЦИИ ПО ИСПОЛЬЗОВАНИЮ РЕЗУЛЬТАТОВ РАБОТЫ		107
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....		108
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....		109
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА		123
Приложение А Результаты микробиологической и биохимической идентификации культур, полученные при первичном посеве биологического материала из зубодесневых карманов на питательную среду		127
Приложение Б Результаты микробиологической и биохимической идентификации культур, полученные при первичном посеве биопсийного материала на питательную среду		131

Приложение В Результат исследования проб добровольцев на наличие <i>H. pylori</i> с использованием бактериологического и молекулярно-генетического методов ..	133
Приложение Г Результат исследования проб добровольцев на наличие белка CagA <i>H. pylori</i> с использованием экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы.....	135
Приложение Д Акты о внедрении результатов диссертации	136

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. С момента открытия в 1983 г. австралийскими учеными В. Marshall и J. Warren бактерии *Helicobacter pylori* научный интерес к данному микроорганизму продолжает расти [1, 2].

По данным литературы, *H. pylori* инфицировано 80,0-90,0 % жителей развивающихся стран Азии и Африки, 40,0-80,0 % жителей Восточной Европы и Южной Америки, 25,0-40,0 % населения развитых стран Европы и Северной Америки [3]. Распространенность инфекции, вызываемой *H. pylori*, среди взрослого населения в России составляет от 65,0 до 92,0 % [4]. При обследовании взрослого населения Москвы хеликобактериоз был выявлен у 88,0 % [5].

Бактерии *H. pylori*, в 70,0-80,0 % случаев являются причиной развития хронического гастрита, в 50,0-60,0 % случаев – важнейшим фактором патогенеза язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и желудка, более чем у 90,0 % пациентов вызывает развитие MALT-лимфом желудка, ассоциированной с *H. pylori* [6].

Согласно докладу Московского научно-исследовательского онкологического института им. П. А. Герцена «Состояние онкологической помощи населению России в 2018 г.» около 625 тыс. новых случаев заболевания раком зарегистрировано в России за 2018 г., 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 % [7]. Установлено, что инфицирование *H. pylori* является причиной как минимум 327 тыс. новых случаев рака желудка в год [8].

Азиатско-Тихоокеанский консенсус по раку желудка настоятельно рекомендует применение стратегии диагностического скрининга и выявления лиц, инфицированных *H. pylori* [9, 10]. Согласно клиническим рекомендациям Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению инфекции *H. pylori* наиболее эффективным методом профилактики рака желудка является эрадикационная терапия [11].

Все это обосновывает разработку новых методов диагностики хеликобактериоза и алгоритма грамотного назначения лечения пациентов, страдающих хеликобактериозом [12].

Хотелось бы отметить, что тяжесть хронических заболеваний, вызываемых *H. pylori*, зависит от степени патогенности штаммов. Поэтому, несмотря на высокую инфицированность данными микроорганизмами, не все пациенты должны получать трех- четырехкомпонентную схему лечения, не лишенную своих побочных действий.

Большинство имеющихся в настоящее время методов диагностики направлено на выявление антител к возбудителю хеликобактериоза либо на недифференцированную по уровню патогенности индикацию самого микроорганизма. Определение динамики антител в сыворотке пациентов лишь косвенно может свидетельствовать об эффекте эрадикационной терапии. Определение *H. pylori* без дифференцировки уровня патогенности микроорганизма не позволяет обосновать целесообразность назначения антибактериальной терапии.

Наиболее актуальным, для рационального назначения антихеликобактерной терапии, является выявление белка CagA *H. pylori* в биологическом материале, полученном от пациентов, страдающих хроническими заболеваниями желудочно-кишечного тракта желудка и двенадцатиперстной кишки. 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 [13]. Известно, что у пациентов, страдающих хеликобактериозом, вызванным *cagA*-положительными штаммами (*cagA*⁺) *H. pylori*, риск развития кишечной метаплазии в 12 раз, а атрофического гастрита в 3 раза выше по сравнению с инфицированными *cagA*-отрицательными штаммами (*cagA*⁻) микроорганизма [14].

Среди современных методов диагностики, применяемых для диагностики инфекционных заболеваний, в том числе диагностики хеликобактериоза, наиболее перспективными в последнее время, благодаря своей экспрессности и высокой чувствительности, принято считать иммунохроматографические тесты [9].

В настоящее время в России отсутствуют иммунохроматографические тест-системы для выявления белка CagA *H. pylori* отечественного производства, имеются лишь зарубежные аналоги. Все вышесказанное обосновывает актуальность разработки иммунохроматографической тест-системы, направленной на выявление пациентов, инфицированных высокопатогенными штаммами *H. pylori* с целью обоснованного назначения им эрадикационной терапии.

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», Inc., США; «Хелико Стик», «Novamed», Израиль; «SD BIOLINE *H. pylori* Ag», «Standard Diagnostics, Inc». Республика Корея). Среди них, 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 отсутствует иммунохроматографическая тест-система, состоящая из отечественных иммунохимических компонентов, предназначенная 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.

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 «Иммунохроматографическая 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 *H. pylori*, обосновании важности выявления высокопатогенных штаммов, секретирующих белок CagA, у лиц, страдающих заболеваниями желудочно-кишечного тракта, которые вызывают развитие кишечной метаплазии, атрофического гастрита, рака желудка.

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 экспресс-метода диагностики лиц, нуждающихся в обоснованном назначении антихеликобактерной терапии.

Систематизированы данные 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 (п. 5.1).

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, Приложение Д); 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., Приложение Д). – Учрежденческий уровень внедрения.

Методология и методы исследования. В работе использовали следующие методы исследования: микробиологические, молекулярно-генетические, серологические – 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 HP-387 («Биалекса», Россия) с наночастицами коллоидного золота диаметром 30 нм, и нанесены в поперечном направлении в тестовой зоне моноклональные антитела HP-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 диссертационного исследования подтверждается достаточным количеством экспериментов, использованием современных методов исследования, которые соответствуют поставленным в работе задачам, воспроизводимостью результатов и применением методов статистического анализа. Научные положения, выводы и рекомендации, сформулированные в диссертации, подтверждены статистически достоверными результатами, наглядно представленными в приведенных рисунках и 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 за возможность проведения научного исследования на базе лаборатории кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», к.б.н., старшему научному сотруднику А.В. Чернядьеву за возможность оценки результатов исследования на базе центра «Нанотехнологии», коллективу кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «ВятГУ».

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1 *Helicobacter pylori* как этиологический агент заболеваний желудочно-кишечного тракта

Инфекция, вызываемая *H. pylori*, является одной из наиболее распространенных на Земле. Естественным резервуаром *H. pylori* прежде всего является человек, однако инфекция обнаруживается также у кошек, человекоподобных обезьян и свиней. Среди механизмов передачи инфекции можно выделить следующие: фекально-оральный, орально-оральный и искусственный. Фекально-оральный механизм передачи реализуется через загрязненную питьевую воду. Установлено, что *H. pylori* способны выжить до двух недель в холодной морской и речной воде, заражение также может произойти при употреблении в пищу сырых овощей, для поливки которых использовалась необработанная сточная вода. Орально-оральный путь заражения менее характерен. Имеются данные с высокой выживаемости бактерий в зубном налете и слюне, следовательно, инфекция передается в быту от зараженного человека через посуду, предметы личной гигиены. Наименее распространенный путь заражения искусственный – через недостаточно продезинфицированные эндоскопы и щипцы для биопсии [15].

По литературным данным, до половины населения во всем мире инфицированы этим микроорганизмом [9, 10]. Установлено, что распространенность инфекции зависит от социально-экономических условий [12]: в развивающихся странах более 80,0 % взрослого населения больны хеликобактериозом, а в развитых число инфицированных находится в пределах 20,0-50,0 % [15].

К перечню нозологических форм, этиологическим агентом которых являются *H. pylori*, относятся хронический гастрит, язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки и желудка, MALT-лимфома, рак желудка [16]. В большинстве случаев в результате персистенции *H. pylori* развивается хронический гастрит, который в 90,0 % случаев протекает без клинических проявлений [17-19]. Однако в последнее

время активно ведутся работы по изучению роли бактерий в развитии рака желудка. Международное агентство по изучению рака (IARC) отнесло *H. pylori* к канцерогенам I класса [20].

Известны два механизма *H. pylori*-ассоциированного канцерогенеза – не прямой и прямой.

Непрямой механизм связан с хроническим воспалительным ответом, вызванным усилением секреции цитокинов слизистой желудка вследствие инфицирования *H. pylori*, что приводит к активации клеточного метаболизма и увеличению количества митотических ошибок [21]. Направленные в зону с воспалением макрофаги и нейтрофилы синтезируют активные формы кислорода, которые повреждают ДНК клеток слизистой желудка, что увеличивает риск развития рака желудка.

Прямой механизм канцерогенеза заключается в онкогенном действии факторов вирулентности, которые находятся в «островке патогенности» CagPAI. Штаммы, вырабатывающие белок CagA, могут напрямую индуцировать мутации генов, усиливая экспрессию AID (Activation Induced Deaminase), что приводит к появлению изменений в ДНК [22]. Имеются литературные данные, касающиеся того, что BabA⁺ штаммы вызывают двуцепочечные разрывы ДНК, что также способствует развитию рака желудка [23].

1.2 Микробиологическая характеристика *Helicobacter pylori*

H. pylori – мелкие, микроаэрофильные, грамотрицательные, неспорообразующие бактерии, по форме представляющие собой S-образные или слегка изогнутые палочки [24]. В связи со старением бактериальной культуры или при неблагоприятных воздействиях внешней среды (изменении температуры или pH), могут переходить в кокковую форму [25]. Толщина бактериальной клетки составляет 0,5-1,0 мкм, длина – 2,5-3,5 мкм. Сверху клетка покрыта гладкой оболочкой, а на одном из полюсов у неё имеются 1-6 мономерных жгутиков. Снаружи от мембраны бактерии расположен электронноплотный гликокаликс толщиной более 40 нм, в

состав которого входят углеводсодержащие полимеры, необходимые для адгезии *H. pylori* на поверхности эпителиоцитов.

Бактерии *H. pylori* являются микроаэрофилами, требующими оптимального содержания кислорода для выращивания – не более 5,0 %, азота – 85,0 %, углекислого газа – 10,0 %. В строго анаэробных условиях хеликобактерии не растут [26]. Благоприятными условиями для жизни и размножения микроорганизмов является температура 37 °С, рН среды от 4,0 до 6,0 [27]. В ходе эволюции бактерии приобрели необходимые свойства для обитания в кислой среде желудка. Данные исследований подтверждают, что *H. pylori* сохраняют жизнеспособность при рН 1,0-1,5 в течение 30 мин в присутствии 0,05 М мочевины [28].

Для культивирования *H. pylori* используют среды с добавлением 5,0-10,0 % крови или сыворотки животных (лошади, барана), шоколадный агар (при этом используются лизированные нагреванием эритроциты, поэтому кровь приобретает шоколадный цвет, а ростовые вещества становятся более доступными для клеток). Селективность питательной среды достигается добавлением антибиотиков (ванкомицина, полимиксина, нистатина, амотерицина и др.). К ростовым добавкам, добавляемым в питательную среду для культивирования хеликобактерий, относятся яичный желток, крахмал, БСА, уголь, гемин [29].

При посеве на влажные питательные среды бактерии растут в виде глянцевой пленки. На подсушенных агаровых средах через 48-72 ч образуются прозрачные около 1 мм в диаметре глянцевые колонии. На жидких питательных средах бактерии растут с очень слабым помутнением среды и формированием серо-голубой пленки на поверхности [30].

При использовании общепринятых методов исследования ферментативную активность по отношению к углеводам выявить не удастся. Большинство видов образуют каталазу, оксидазу, редуцируют нитраты, вырабатывают щелочную фосфатазу, алкогольдегидрогеназу, липазу, уреазу [29, 30]. Для дифференцировки от бактерий семейства *Campylobacteriaceae* используют определение способности выделенных штаммов расти в средах, содержащих 2,3,5-трифенилтетразолин хлорид (0,4 и 1 мг·л⁻¹), селенит натрия (0,1 %), глицин (1,0 %); отсутствие роста в 8,0 %

растворе глюкозы и 3,5 % хлорида натрия. Кроме того, род *H. pylori* чувствителен к цефалотину и устойчив к налидиксовой кислоте [29].

1.3 Факторы патогенности *Helicobacter pylori*, способствующие развитию заболеваний желудочно-кишечного тракта

H. pylori относятся к числу патогенных бактерий. В зависимости от обстоятельств бактерии могут вести себя как комменсалы и даже как симбионты [24] и обладают рядом факторов патогенности, которые условно можно разделить на факторы колонизации, факторы персистенции и факторы, вызывающие заболевание [15].

Подвижность – ведущий фактор колонизации *H. pylori*, связанный с наличием жгутиков, обеспечивающих быстрое передвижение микроорганизмов в слое густой слизи вдоль градиента pH [31]. Жгутики *H. pylori* представлены комплексом белков – флагеллинами HpaA, FlaA, FlaB, FlaD, FlgK [29].

Помимо подвижности, важную роль в процессе колонизации слизистой оболочки желудка (СОЖ) играет механизм защиты бактерий от кислой среды желудка. Для этого клетки окружены плотной гладкой клеточной стенкой и гликокаликсом, которые не только защищают бактерии от низкой pH среды, но и способствуют антибиотикоустойчивости и защите микроорганизмов от иммунного ответа хозяина. В состав гликокаликса входят углеводсодержащие полимеры (липополисахариды) и белки, необходимые для адгезии.

Важнейшим фактором патогенности является адгезия *H. pylori* к эпителиоцитам желудка, которая облегчает доступ микроорганизмов к питательным веществам и доставку эффекторных молекул. Рецепторы для бактерий обнаружены в слизи. Ими являются остатки сиаловых кислот, сульфогруппы гликопротеинов, гликолипидов, фосфолипидов. Также обнаружена способность микроорганизмов прикрепляться к белкам соединительной ткани, таким как коллаген, ламинин, витронектин [29].

Для создания оптимальной pH *H. pylori* продуцируют фермент уреазу, который вызывает расщепление мочевины с образованием углекислого газа и аммиака, нейтрализующего соляную кислоту желудочного сока [31]. Активность фермента регулируется специальными мембранными каналами UreI, которые открываются при низком pH среды и закрываются при нейтральном [32]. Кроме этого, уреазы действует как токсин. Ионы аммония, образующиеся при гидролизе мочевины, повреждают эпителий, что усиливает воспалительные реакции за счет активации моноцитов и нейтрофилов, стимулирует секрецию цитокинов, образование радикалов кислорода и окиси азота [31].

Персистенции бактерий в организме хозяина способствуют литические ферменты, синтезируемые *H. pylori*, – липаза, муциназа, протеаза, каталаза. Фосфолипазы бактерий гидролизуют фосфолипиды мембран желудочных клеток и желчи с образованием высокотоксичных лизолецитинов, а также разрушают гидрофобный слой слизи, содержащий фосфолипиды и предохраняющий эпителий от прямого воздействия соляной кислоты и пепсина. Протеаза разрушает защитные белковые комплексы, а муциназа – белок муцин, содержащийся в желудочной слизи. Вследствие этого вокруг бактерий происходит формирование зоны локального снижения вязкости желудочной слизи, уменьшаются ее гидрофобные свойства и толщина, нарушается слоистая структура геля слизи. Выделение каталазы позволяет *H. pylori* подавлять иммунный ответ организма, катализирует реакцию превращения бактерицидных соединений кислорода, высвобождаемых активированными в результате инфекции нейтрофилами, в такие безвредные вещества, как кислород и вода, что позволяет *H. pylori* избежать деструктивного воздействия со стороны нейтрофилов.

Инфицирование *H. pylori*, с одной стороны, приводит к повреждению слизистого барьера желудка и большей уязвимости эпителиоцитов, а с другой, повышает агрессивные свойства (кислотность) желудочного сока. Совокупность этих процессов усугубляет повреждение клеток слизистой оболочки желудка, вызывая их дистрофию и гибель, что облегчает проникновение бактерий вглубь слизистой оболочки [31].

Тяжесть хронических заболеваний, вызываемых *H. pylori*, зависит от степени патогенности штаммов, наличия тех или иных цитотоксических генов, входящих в «остров патогенности» микроорганизма. Среди них наибольшее значение имеют следующие гены – факторы вирулентности:

vacA (vacuolating cytotoxin-associated gene) – вакуолизирующий цитотоксин-ассоциированный ген, присутствует в геномах всех штаммов *H. pylori*, активирует процесс образования вакуолей в клетках эпителия, что способствует проникновению бактерий внутрь клеток. Продукт гена *vacA* – цитотоксин (140 кДа) – увеличивает проницаемость мембраны клеток эпителия по отношению к анионам, нарушает транспорт белков, повреждает цитоскелет и стимулирует апоптоз клеток. Выделяют подтипы (*s1a*, *s1b*, *s1c*, *s2*) и аллельные комбинации (*m1* и *m2*) этого гена. Наиболее патогенные штаммы имеют генотип *s1/m1*, а штаммы с генотипом *s2/m2* почти не обладают цитотоксической активностью [15].

cagA (cytotoxic-associated gene) – цитотоксин ассоциированный ген, обнаруживаемый лишь у некоторых штаммов *H. pylori*. Кроме того, ген может быть представлен также в разных аллельных вариациях. Ген *cagA* является маркёром «острова патогенности», содержащего около 30 генов. Ген *cagA* является специфическим для данной бактерии, поскольку возник в связи с обитанием *H. pylori* в желудке [33]. Белок CagA ассоциирован с язвенной болезнью, раком желудка и лимфомой. Поступление в эпителиоциты слизистой оболочки желудка белка CagA вызывает мобилизацию и реорганизацию актина, индукцию ростковых факторов, продукцию различных цитокинов. Считается, что у таких пациентов риск развития кишечной метаплазии в 12 раз, а атрофического гастрита в 3 раза выше по сравнению с инфицированными CagA⁻ штаммами. Генотип *cagA*⁺*vacA*⁺ достоверно чаще ассоциируется с гастродуоденальной язвой [14].

iceA (induced by contact with epithelium gene) – ген цитотоксичности, существующий в двух аллельных вариантах *iceA1* и *iceA2*. Белок IceA служит фактором, инициирующим контакт бактерии с эпителиальными клетками.

babA (blood group antigen-binding adhesion) – ген также имеет две аллели – *babA1*, *babA2*. Данные мембранные белки сходны по строению с антигенами групп

крови, что приводит к образованию аутоантител к слизистой оболочке желудка и развитию аутоиммунного гастрита [34, 35]. Белки VabA1, VabA2 связаны с более высокой частотой развития язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и являются факторами адгезии к эпителиоцитам.

dupA (duodenal ulcer promoting gene) – ген, расположенный в пластичном регионе генома бактерии, который изначально был описан как маркер развития язвенной болезни двенадцатиперстной кишки. Позднее была показана связь данного гена с развитием рака желудка, однако до конца функциональная роль данного гена не изучена [36, 37, 38].

В работе Пегашева И.Л. и соавт. выявлена прямая корреляционная связь между наличием факторов патогенности CagA, VacA *H. pylori* и развитием атрофии слизистой оболочки желудка, а также активностью воспаления слизистой оболочки желудка у больных хроническим гастритом [39].

1.4 Методы диагностики хеликобактериоза

После открытия *H. pylori* как этиологического агента заболеваний желудочно-кишечного тракта человека было предложено множество методов диагностики. Их можно разделить на инвазивные, подразумевающие взятие биопсии при эндоскопическом исследовании, и неинвазивные. Для получения достоверных результатов диагностики хеликобактериоза рекомендуется комплексное применение различных методов [30].

Согласно анкетированию врачей из 15 городов России, для первичной диагностики хеликобактериоза врачи используют преимущественно инвазивные методы – гистологический (41,8 %) и быстрый уреазный тест (38,0 %). Среди неинвазивных методов используются уреазный дыхательный тест (29,5 %), определение антигена в кале (32,2 %), серологический метод (34,4 %) [40].

В работе Войнован И.Н. и соавт. показано, что пациентам, чей возраст моложе 30-40 лет при отсутствии таких симптомов, как желудочно-кишечное кровотечение, анемия, потеря веса, аппетита, целесообразно проведение неинвазивной

диагностики. У пациентов, имеющих высокий риск развития злокачественных новообразований, в частности семейный анамнез по развитию рака желудка, необходимо выполнение эндоскопического исследования желудка [41].

Среди инвазивных следует остановиться на бактериологическом и морфологическом методах исследования.

Первый осуществляется посредством посева биоптата слизистой оболочки желудка на дифференциально-диагностическую среду и является одним из наиболее информативных, а также специфичных методов диагностики. Однако бактериологический метод не лишен недостатков, к которым относятся продолжительное время исследования (до 10 дней), трудность транспортировки клинического материала, высокие требования к условиям культивирования, снижение эффективности посева материала при низкой обсемененности [42].

К морфологическим методам относятся гистологический, цитологический и иммуногистохимический методы.

Гистологический метод признан «золотым стандартом» диагностики хеликобактериоза. Суть метода заключается в изготовлении гистологических препаратов слизистой оболочки желудка и их окраске по Гимзе, толуидиновым синим, Вартину-Старри, Генте с целью выявления бактериальных клеток в препарате. Метод позволяет определить особенности возбудителя и оценить состояние слизистой оболочки желудка [43].

Иммуногистохимический метод является более специфичным, чем гистологический метод, и обладает лучшими аналитическими характеристиками. Суть метода заключается в обработке гистологических срезов поли- или моноклональными антителами (МкАТ) к выявляемому антигену. Недостатком метода является невозможность применения МкАТ для исследования тканей, фиксированных в формалине [44].

Цитологический метод заключается в окраске бактерии в мазках-отпечатках биоптатов слизистой оболочки желудка по Гимзе, Граму. Помимо выявления в образце *H. pylori* метод позволяет определить степень обсемененности материала:

слабая – до 20 микробных тел в поле зрения; средняя – 20-50 микробных тел в поле зрения; высокая – более 50 микробных тел в поле зрения [45].

Полученный при эндоскопическом исследовании биопсийный материал можно проанализировать на наличие ДНК бактерий методом ПЦР, обладающей высокой специфичностью и чувствительностью, а также путем постановки быстрого уреазного теста, осуществляемого посредством помещения биоптата в жидкую или гелеобразную среду, содержащую субстрат, буфер и индикатор [46]. Ложноположительные результаты уреазного теста могут быть получены при попадании в образец крови, некоторых лекарственных средств или уреазы-позитивных бактерий из ротовой полости [47].

Лазебник Л.Б. и соавт. в своей работе [47] отмечают основной недостаток инвазивных методов – возможность получения «ложноотрицательных» результатов, связанных с «ошибкой образца», если берется только один кусочек биопсии из одного отдела желудка. Поэтому рекомендуется брать на исследование несколько фрагментов слизистой оболочки из различных отделов желудка.

В настоящее время наибольшее распространение получили неинвазивные методы диагностики [48-51].

Разработан тест для определения ДНК *H. pylori* в кале. Однако данные исследования показывают, что метод обладает низкой чувствительностью из-за наличия в кале полисахаридов – ингибиторов ПЦР. Поэтому процесс пробоподготовки и выделения ДНК из кала связан с дополнительной очисткой и концентрированием препаратов ДНК [44].

Дыхательный уреазный тест является важным этапом в диагностике хеликобактериоза. Суть метода заключается в определении в выдыхаемом больным воздухе изотопов ^{14}C или ^{13}C , которые выделяются в результате расщепления в желудке больного меченой этими изотопами мочевины под действием уреазы бактерий *H. pylori* [52, 53].

Наряду с дыхательным уреазным тестом Европейская группа по изучению возбудителя хеликобактериоза рекомендует использовать серологические методы

диагностики (иммуноферментный анализ, иммуноблотинг и др.). Основным недостатком серологических методов является невозможность их применения для контроля эрадикационной терапии, в связи с тем, что лишь спустя 12-21 месяц после эрадикации *H. pylori* выявляется снижение уровня специфических IgG на 20,0 % и показатели чувствительности теста приближаются к 93,0 % [47, 48].

В настоящее время для иммунодетекции бактерий и вирусов часто используют высокочувствительный и высокоспецифичный иммунохроматографический метод, который лишен недостатков, связанных с наличием дорогостоящего оборудования и квалифицированного персонала, а также обеспечивает получение результата в короткий срок.

Иммунохимический метод востребован в клинической диагностике, ветеринарии, оценке безопасности потребительской (прежде всего пищевой) продукции, экологическом мониторинге [54, 55].

Современному понятию «экспрессный иммунохимический тест» в полной мере соответствуют иммунохроматографические тест-системы, позволяющие получить информацию о наличии или отсутствии в пробе выявляемого компонента за 10-25 мин [56]. Принцип метода основан на тонкослойной хроматографии и образовании окрашенного комплекса «антиген-антитело» [57], визуализация которого возможна за счет меченых соединений, в качестве которых чаще всего при разработке иммунохроматографических тест-систем используют наночастицы коллоидного золота [58].

В настоящее время разработано большое количество иммунохроматографических тест-систем, предназначенных для диагностики возбудителей инфекционных заболеваний. В таблице 1 представлена характеристика некоторых из них [59-64].

Таблица 1 – Иммунохроматографические тест-системы, предназначенные для диагностики инфекционных заболеваний

Иммунохроматографическая тест-система, предназначенная для выявления	Характеристика тест-систем	Ссылка на источник
<i>Brucella abortus</i>	Детекция липополисахарида и клеток <i>B. abortus</i> в стандартных растворах и фетальной сыворотке крупного рогатого скота; предел обнаружения АГ: 10 нг·см ⁻³ ; предел обнаружения клеток: 1·10 ⁶ м.к·см ⁻³	[59]
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	Детекция Т2 токсина в растительных экстрактах; предел обнаружения: 3 нг·см ⁻³ при визуальной регистрации результатов; 0,9 нг·см ⁻³ при инструментальной регистрации результатов	[60]
<i>Clostridium botulinum</i>	Определения ботулинического токсина; предел обнаружения: 0,5-5,0 нг·см ⁻³	[61]
<i>Burkholderia mallei</i>	Детекция липополисахаридов С-5 <i>B. mallei</i> ; предел обнаружения липополисахаридов 30 мкг·см ⁻³	[62]
<i>Clostridium botulinum</i>	Мультианалитный иммунохроматографический тест для определения ботулотоксинов типов А и В; предел обнаружения 30 нг·см ⁻³ (для ботулотоксина А) и 10 нг·см ⁻³ (для ботулотоксина В)	[63]
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	Выявление штаммов <i>Y. pseudotuberculosis</i> серогруппы I; предел обнаружения: от 500 тыс. м.к·см ⁻³ до 4 млн м.к·см ⁻³	[64]

Диагностика большинства инфекционных заболеваний, в том числе и хеликобактериоза, направлена на детекцию антигенов возбудителя заболевания. Большинство используемых в настоящее время иммунохроматографических тест-систем направлено на определение поверхностных антигенов. Не является исключением это и для пользующихся в настоящее время популярностью иммунохроматографических тест-систем. В качестве примеров можно привести иммунохроматографические тест-системы для диагностики бруцеллеза [59], псевдотуберкулеза [64], сапа и мелиоидоза [62], направленные на детекцию липополисахарида клеточной стенки микроорганизмов, и обладающие чувствительностью от 5·10⁵ м.к·см⁻³ [64] до 1·10⁶ м.к·см⁻³ [59].

Основные же антигены патогенности *H. pylori*, такие как белок CagA, расположены внутриклеточно, что осложняет анализ с цельными корпускулярными культурами микроорганизма. Высокой чувствительности тест-систем, направлен-

ных на детекцию внутриклеточных антигенов, можно добиться только при тестировании с чистым детектируемым антигеном, если же речь идет о тестировании культуры, то можно ожидать только качественный анализ.

1.5 Основные компоненты иммунохроматографических тест- систем

Иммунохроматографический диагностикум представляет собой мембранный композит, состоящий из нитроцеллюлозной мембраны, мембраны для внесения пробы, конъюгатной мембраны с нанесенным комплексом моноклональных антител с маркером, в качестве которого чаще всего применяют наночастицы коллоидного золота (НчКЗ) [65], и адсорбирующей мембраны. На нитроцеллюлозной мембране формируют тестовую и контрольную зоны путем нанесения специфических иммунохимических компонентов: в тестовой (аналитической) зоне иммобилизованы моноклональные (МкАТ) либо поликлональные антитела (ПкАТ) той же специфичности, что и в конъюгате, в контрольной зоне – антивидовые антитела к моноклональным антителам, входящим в состав конъюгата [66].

Рассмотрим принцип работы иммунохроматографической тест-системы. При нанесении на мембрану для образца пробы, содержащей специфический антиген, он взаимодействует с МкАТ, конъюгированными с НчКЗ. При этом формируется окрашенный иммунокомплекс «антиген-антитело», перемещение которого вдоль нитроцеллюлозной мембраны обеспечивается действием капиллярных сил. При пересечении тестовой зоны комплекс взаимодействует с иммобилизованными МкАТ – тестовая полоса окрашивается в розовый цвет. Несвязавшийся в тестовой полосе конъюгат продолжает перемещение вдоль нитроцеллюлозной мембраны и взаимодействует с иммобилизованными в контрольной полосе антивидовыми антителами. В результате контрольная полоса также окрашивается в розовый цвет. Формирование контрольной полосы является обязательным и свидетельствует о качестве тест-системы.

Результат реакции определяют визуально, в зависимости от вида иммунохроматографической тест-системы, в течение 10-25 мин. При наличии детектируемого

антигена в пробе образуются две окрашенные полосы – тестовая и контрольная, при отрицательном результате тестирования – только контрольная. Если контрольная полоса не проявилась, результат теста нельзя считать достоверным.

1.6 Пути повышения специфичности и чувствительности иммунохроматографических тест-систем

Анализ путей повышения специфичности и чувствительности иммунохроматографических тест-систем является неотъемлемой частью их разработки. Оценка условий, влияющих на вышеуказанные показатели, проводится на основных этапах производства: выбора оптимального размера наночастиц коллоидного золота, определения концентрации иммунохимических компонентов, оптимальной комбинации буферных растворов, а также мембран в мультимембранном композите.

1.6.1 Выбор оптимального размера наночастиц коллоидного золота

Для иммунохроматографии обычно используют маркеры, обладающие следующими свойствами: простотой детекции, высокой чувствительностью, сохранением детектируемых свойств при работе со сложными матриксами, стабильностью конъюгата «маркер-иммунореагент» при хранении.

Вышеуказанными характеристиками обладают такие маркеры, как ферменты, органические флуорофоры, липосомы и наночастицы коллоидного золота (НчКЗ) [67]. В последнее время наибольшую популярность приобрели наночастицы коллоидного золота. Достаточно широкое использование НчКЗ в качестве маркера в иммунохроматографии связано с относительной простотой их получения и возможностью визуальной детекции результатов анализа, которая обусловлена эффектом поверхностного плазменного резонанса [68].

Коллоидное золото имеет более чем тысячелетнюю историю. Но начало применения НчКЗ в биологических исследованиях датируется лишь 1971 г., когда была опубликована статья сотрудников факультета зоологии и биохимии университета

Северного Уэльса В.П. Фолка и Г.М. Тейлора «Иммуноколлоидный метод для электронной микроскопии» [68].

Несмотря на многочисленные исследования, вопрос об оптимальном размере НчКЗ для иммунохроматографии до сих пор остается открытым [69, 70]. В иммунохроматографии находят применение препараты НчКЗ как малого диаметра – 3-5 нм, с практически эквимольным соотношением антитело : коллоид в конъюгате, так и большого диаметра – до 50 нм [71]. Переход к более крупным частицам осложняется необходимостью применения условий по обеспечению их стабильности в растворе и предотвращению агрегации. Изменяя условия синтеза НчКЗ, можно получить препараты различной формы и размера.

В таблице 2 представлены размеры НчКЗ, которые, по данным научных исследований, наиболее часто использовали для разработки иммунохроматографических тест-систем [59, 60, 62-64, 72-78].

Таблица 2 – Размеры наночастиц коллоидного золота, наиболее часто используемые для разработки иммунохроматографических тест-систем

Иммунохроматографическая тест-система, предназначенная для детекции	Размер НчКЗ, нм	Ссылка на источник
<i>H. pylori</i>	34	[72]
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	30	[73]
<i>Burkholderia mallei</i>	20	[62]
T2-токсин	27	[60]
<i>Plasmodium falciparum</i>	20	[74]
<i>Tobacco mosaic virus</i>	20	[75]
<i>Brucella abortus</i>	34	[59]
<i>Listeria monocytogenes</i>	30	[76]
<i>Potato virus X</i>	15	[77]
<i>Clostridium botulinum</i>	25	[63]
<i>Mycobacterium tuberculosis</i>	20	[78]
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	30	[64]

Представленные в таблице 2 данные показывают, что наиболее оптимальными для использования в качестве маркера в иммунохроматографии являются

НчКЗ с диаметром 25-30 нм. Указанный размер сферических частиц обеспечивает эффективную сорбцию МкАТ на тест-полоске, облегчает миграцию меченных коллоидным золотом антител через пористую структуру мембран тест-полоски, что обеспечивает визуальную детекцию сигнала с максимальной чувствительностью [78].

Основной метод получения НчКЗ заданного размера является цитратный метод Френса [79]. Согласно методике, к кипящему 0,01 % водному раствору золотохлористоводородной кислоты $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (ЗХВК) добавляют 1,0 % водный раствор цитрата натрия в объеме, зависящем от требуемого размера частиц. Объем 1,0 % раствора цитрата натрия, который необходимо добавить на 100 мл золя для получения заданного размера НчКЗ, рассчитывают по следующей формуле 1 [80]:

$$V = \frac{-0,855 \sqrt{d}}{\sqrt{38,2}}, \quad (1)$$

где d – средний диаметр НчКЗ, нм;

V – объем 1,0 % раствора цитрата натрия.

Однако при анализе научной литературы выявлено, что существуют различные модификации метода Френса. Например, в одних источниках хлористоводородную кислоту добавляют сразу, а цитрат натрия – при закипании, в других – и тот, и другой реагент вносят последовательно при закипании [81].

Имеются расхождения, которые касаются объема, вносимого в раствор ЗХВК цитрата натрия для получения частиц с заданным размером. Сравнительный анализ объема цитрата натрия, вносимого в 100 мл раствора ЗХВК для получения НчКЗ определенного диаметра по методу Френса, при расчете в соответствии с формулой 1, и данными научных статей, представлен в таблице 3 [80].

Таблица 3 – Сравнительный анализ количества цитрата натрия, вносимого в раствор ЗХВК, для получения НчКЗ различного диаметра в расчете на 100 мл золя при приготовлении его по методу Френса

Диаметр наночастиц коллоидного золота, нм	Объем цитрата натрия (мл), вносимого в раствор ЗХВК, для получения наночастиц коллоидного золота различного диаметра из расчета на 100 мл золя при приготовлении его по методу Френса		Ссылка на источник
	при расчете по формуле 1	по данным статей	
10	4,795	6,000	[81]
15	2,984	1,539	[82]
		3,192	[81]
20	2,132	2,201	[81]
25	1,642	1,942	[82]
		1,776	[81]
30	1,326	1,467	[81]
		1,492	[82]

Примечания:
 1. V (мл) – объем цитрата натрия, необходимого для получения определенного диаметра НчКЗ.
 2. d – диаметр НчКЗ, нм

Из данных, представленных в таблице 3, следует, что при приготовлении по методу Френса НчКЗ большего диаметра количество цитрата натрия, добавляемого в раствор, уменьшается как по данным литературных источников, так и при расчете по формуле. Однако в первом случае цитрата натрия рекомендуют добавлять меньше, чем во втором. В связи с этим можно сделать вывод, что до настоящего времени нет единого алгоритма синтеза наночастиц с заданным размером [83].

1.6.2 Использование приемов усиления оптического сигнала в тестовой зоне тест-системы

Существуют различные методики усиления оптического сигнала, генерируемого НчКЗ в тестовой зоне иммунохроматографической тест-системы. Одни основаны на применении ферментов [84], другие – на использовании наночастиц или солей серебра [72]. Имеются работы, в которых одновременно применяли два препарата НчКЗ с разным диаметром частиц [85].

В работе Parolo С. и соавт. предложена иммунохроматографическая тест-система, в которой НчКЗ конъюгированы с антителами и пероксидазой. После проведения иммунохроматографии тест-полоску отмывают от несвязавшихся реагентов и погружают в раствор субстрата пероксидазы (тетраметилбензидина), дающего

ярко-синий нерастворимый продукт окисления. Усиление окрашивания позволило снизить предел обнаружения с $5 \text{ нг}\cdot\text{см}^{-3}$ до $200 \text{ пг}\cdot\text{см}^{-3}$ [84].

Дрыгин Ю.Ф. и соавт. предложили использовать наночастицы серебра диаметром 20 нм, агрегированные на поверхности НчКЗ (диаметр 20 нм) и в 10 раз увеличивающие интенсивность окрашивания [75].

Стоит отметить, что дополнительные стадии увеличивают продолжительность анализа. Так, в работе Parolo С. время анализа увеличилось с 10 мин до 25 мин в связи с введением дополнительных этапов по усилению окрашивания тестовой зоны [84].

Методика усиления серебром основана на реакции физического проявления, используемой в фотографии. Наночастицы катализируют восстановление ионов серебра из соли до металлического серебра. Оболочка металлического серебра вокруг частицы золота, в свою очередь, ускоряет восстановление, и реакция становится автокаталитической. Впервые эта методика была использована в 1981 г. для гистохимического анализа, гидрохинон в данном опыте использовался в качестве восстановителя лактата серебра [81]. И в настоящее время методика является актуальной.

Так, например, иммунохроматография с усилением окрашивания лактатом серебра тестовой и контрольной зон была использована в работе Бызовой Н.А. и соавт. Для этого применяли два листа мембраны для конъюгата («PT-R5», «MDI», Индия), трижды промывали их дистиллированной водой и высушивали. Первую пропитывали 0,3 % раствором лактата серебра, растворенного в деионизированной воде, вторую – в 0,5 М цитратным буфером, pH 4,0, содержащем 3,0 % гидрохинон [72].

Процедура усиления чувствительности тест-системы выглядит следующим образом: на нитроцеллюлозную мембрану после внесения пробы, содержащей антиген, и появления окрашенных тестовой и контрольной зон, на область расположения тестовой и контрольной зон накладывали последовательно две мембраны – сначала с лактатом серебра, поверх нее – с гидрохиноном, затем капали 100 мкл

дистиллированной воды. Через 10 мин мембраны снимали и регистрировали результат. Проведенная манипуляция позволила повысить предел обнаружения детектируемого антигена в 10 раз (с $0,4 \text{ мкг}\cdot\text{см}^{-3}$ до $0,03 \text{ мкг}\cdot\text{см}^{-3}$).

1.6.3 Определение концентраций специфических иммунохимических компонентов

К основными иммунохимическими компонентами иммунохроматографических тест-систем относятся: антитела, входящие в состав конъюгата с наночастицами коллоидного золота; МкАТ или ПкАТ, формирующие тестовую полоску; антивидовые антитела (АвАТ), нанесенные на контрольную зону.

Вопрос об оптимальной концентрации МкАТ в составе конъюгата с НчКЗ возникает каждый раз при разработке новой тест-системы. Существует правило, согласно которому в ИХА для приготовления конъюгатов используют антитела с концентрацией, на 10,0-20,0 % превышающей минимальную, достаточную для предотвращения агрегации НчКЗ в растворах, содержащих 10,0 % раствор хлорида натрия [86, 87]. Увеличение концентрации антител может привести к уменьшению чувствительности иммунохроматографической тест-системы.

Представленная закономерность изучена в работе Титова А.А. и соавт., целью которой явилась оптимизация иммунохроматографической тест-системы для обнаружения ботулинических токсинов. Исследование показало уменьшение пороговой концентрации детектирования токсинов в пробе при увеличении концентрации антител в конъюгате в два раза относительно концентрации, определенной при построении флокуляционных кривых. Однако дальнейшее увеличение нагрузки конъюгатов приводило к появлению неспецифической сорбции конъюгатов в тестовой зоне [61].

Данные научных статей, касающихся разработки иммунохроматографических тест-систем, показывают, что оптимальная концентрация антител в конъюгате варьирует в зависимости от индивидуальных особенностей белкового препарата. Рассмотрим несколько примеров. При разработке иммунохроматографической

тест-системы для детекции антигенов *H. pylori* значение данного параметра составило $19 \text{ мкг}\cdot\text{см}^{-3}$ [72], для обнаружения Т-2 токсина – $30 \text{ мкг}\cdot\text{см}^{-3}$ [60], для диагностики сапа и мелиоидоза – $5,5 \text{ мкг}\cdot\text{см}^{-3}$ [62].

Не меньшее влияние на чувствительность тест-системы оказывает концентрация МкАТ, используемых для формирования тестовой зоны. В работе Титова А.А. и соавт. [61] предел обнаружения ботуллинического токсина уменьшался при повышении концентрации МкАТ с 50 до $150 \text{ нг}\cdot\text{см}^{-3}$.

Оптимальная концентрация иммунореагентов, наносимых на нитроцеллюлозную мембрану для формирования тестовой зоны, находится в диапазоне $0,5\text{-}3 \text{ мкг}\cdot\text{см}^{-3}$. Превышение этого уровня приводит к увеличению несорбированных на поверхности мембраны молекул и к снижению аналитических характеристик тест-системы. Использование меньших концентраций антител в большинстве случаев недостаточно для эффективного специфического взаимодействия, что снижает интенсивность окраски тестовой зоны и, как следствие, приводит к снижению чувствительности диагностикума [88].

Существуют ограничения, касающиеся концентрации антител в контрольной зоне. Как правило, для формирования контрольной зоны наносят антивидовые антитела в концентрации $1 \text{ мкг}\cdot\text{см}^{-3}$ [73, 89]. Применение антител с более низкой концентрацией может также привести к снижению аналитических характеристик тест-системы [90].

1.6.4 Выбор состава и комбинаций буферных растворов

Выбор оптимальных буферных растворов, их сочетания, рН, в значительной степени оказывает влияние на чувствительность и специфичность иммунохроматографических тест-систем. Среди буферов, применяемых для создания иммунохроматографических тест-систем, выделяют следующие [92]:

- буферный раствор для приготовления и хранения конъюгата – буфер хранения (БХ);
- буферный раствор для диализа антител (при необходимости);

- буферный раствор для разведения антител;
- буферный раствор для отмывки конъюгата от несвязавшихся антител и доведения его концентрации до необходимой оптической плотности – буфер отмывки (БО);
- буфер разгона (БР), применяемый при анализе тест-системы.

Коммерческие МкАТ или ПкАТ, применяемые для создания иммунохроматографических тест-систем обычно находятся в 0,1 М ФСБ, рН 7,4 с добавлением 0,09 % NaN_3 [91]. Для повышения специфичности создаваемой тест-системы перед конъюгированием с НчКЗ МкАТ переводят посредством диализа из буфера хранения в буфер для приготовления конъюгата.

В работе Кудайбергенова Э.Б. [92] при разработке иммунохроматографической тест-системы для детекции *Mycobacterium bovis* сравнивали две технологий конъюгирования МкАТ с НчКЗ. В первом случае МкАТ разводили до необходимой концентрации в 0,01 М Трис-буфере с рН 8,5 с добавлением БСА и конъюгировали их с НчКЗ, находящимися в карбонатном буфере с тем же значением рН – 8,5. После инкубации конъюгат отмывали от несвязавшихся антител в 0,001 М Трис-буфере с рН 8,5 методом центрифугирования три раза в течение 30 мин при $10000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$.

Согласно второй технологии антитела растворяли в 0,005 М боратном буфере с рН 9,0, затем их вносили в раствор НчКЗ с рН 7,0. Полученный раствор перемешивали в течение 30 мин, после чего добавляли 5,0 % раствор БСА в 0,005 М NaCl . Конъюгат центрифугировали при $14000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$ в течение 30 мин. Осадок ресуспендировали в 0,049 мМ Na_2HPO_4 с 1,0 % БСА.

Исследование показало, что наибольшую чувствительность тест-системе для диагностики *M. bovis* обеспечивал конъюгат, приготовленный по первой методике, что доказывает влияние состава буферных растворов на качество создаваемых иммунохроматографических тест-систем.

В работе Титова А.А. и соавт. [61], посвящённой созданию иммунохроматографической тест-системы для детекции ботулинических токсинов, проводили

оценку влияния буфера для приготовления конъюгата и рН буфера разгона на чувствительность тест-системы. Для сравнения использовали шесть видов БХ, представленных в таблице 4, а в качестве буфера разгона применяли 0,1 М фосфатный буфер с 0,4 % Tween 20 и 0,25 % БСА с рН 4,9, 6,0, 7,8. Оценка влияния сочетания буферных растворов на возникновение неспецифической реакции в тестовой зоне по шкале от 1 до 10 представлены в таблице 4, где «0» означает отсутствие неспецифического связывания, «10» – максимальный неспецифический сигнал.

Таблица 4 – Интенсивность окрашивания тестовой зоны в зависимости от используемого буфера хранения конъюгата и уровня рН буфера разгона

Вариант буфера хранения	Состав	Интенсивность окраски тестовой зоны, усл.ед.		
		рН буфера разгона		
		4,9	6,0	7,8
БХ-1	Водный 10,0 % раствор сахарозы с 0,25 % БСА, рН 6,0	9,3	2,3	0
БХ-2	0,05 М Трис-буфер с 10,0 % сахарозой и 0,25 % БСА, рН 8,5	4,2	1,2	0
БХ-3	0,05 М К-На фосфатный буфер с 10,0 % сахарозой и 0,25 % БСА, рН 8,0	3,1	1,5	0
БХ-4	0,05 М Трис-буфер с 20,0 % сахарозой и 0,25 % БСА, рН 8,5	3,1	1,1	0
БХ-5	0,05 М Трис с 10,0 % сахарозой и 1,0 % БСА, рН 8,5	3,8	0,9	0
БХ-6	0,05 М Трис-буфер с 20,0 % сахарозой и 1,0 % БСА, рН 8,5	2,1	0,3	0

Наилучший порог чувствительности показала тест-система, в основе которой был БХ-1, однако из-за отсутствия солей в составе буфера данный вариант оказался наиболее чувствителен к изменению рН. Исходя из данных таблицы, в качестве наиболее перспективного варианта была выбрана комбинация из БХ-6 для приготовления конъюгата и буфера разгона с рН 7,8.

Работа Урусова А.Е. и Жердева А.В. [88], посвящённая разработке иммунохроматографической тест-системы для детекции *Brucella abortus*, была направлена на оценку влияния состава и рН буферного раствора на интенсивность сигнала в тестовой и контрольной зонах. На рисунке 1 изображён график зависимости интенсивности окраски тестовой зоны от состава и рН буферного раствора.

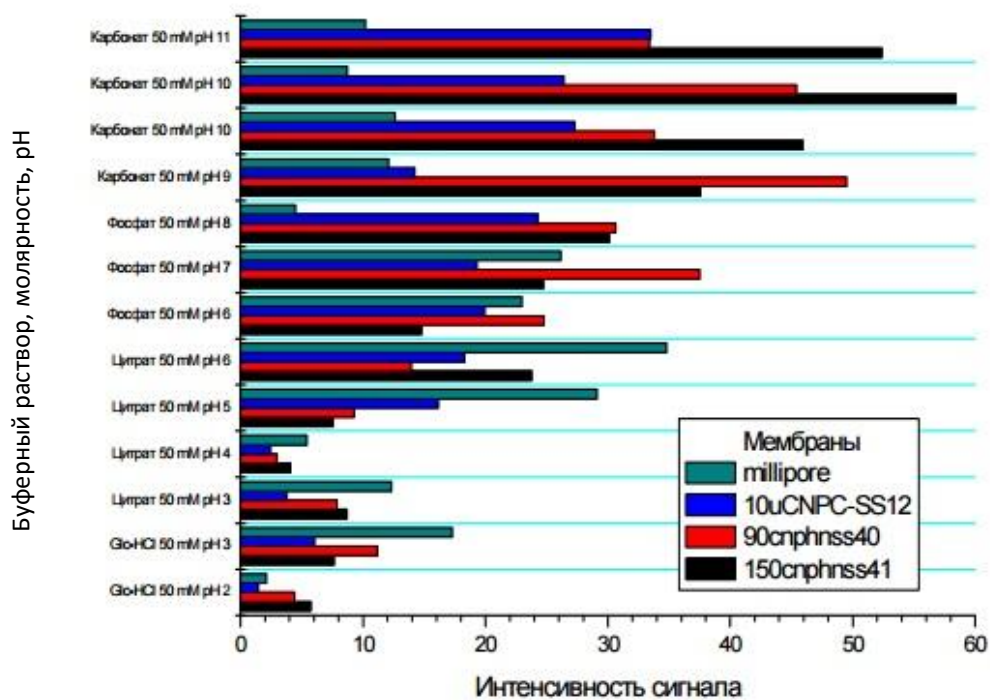


Рисунок 1 – Интенсивность сигнала (яркость окраски) тестовой зоны при использовании конъюгатов, приготовленных на основе буферных растворов различного состава [88]

Результаты исследования свидетельствуют о том, что чувствительность тест-системы была наилучшей при использовании фосфатного и карбонатного буферных растворов с рН 8-9, поскольку данное значение рН обеспечивало равномерное распределение зарядов на поверхности белковой молекулы, что способствовало электростатическому взаимодействию и лучшей иммобилизации реагентов на мембране.

При разработке нового вида тест-систем каждый раз возникает вопрос о выборе оптимального сочетания компонентов, которое обеспечивало бы максимальную чувствительность создаваемого диагностикума. В таблице 5 представлены данные научных статей, посвящённых разработке различных иммунохроматографических тест-систем и выбору комбинации буферных растворов, используемых на разных этапах их создания.

Таблица 5 – Комбинации буферных растворов, применяемые при разработке и анализе иммунохроматографических тест-систем [93]

Иммунохроматографическая тест-система, предназначенная для детекции...	Характеристика буферного раствора, используемого для...				Ссылка на источник
	диализа АТ	приготовления рабочего буфера	отмывки конъюгата от несвязавшихся АТ и доведения его концентрации до необходимой оптической плотности	приготовления буфера разгона	
<i>H. pylori</i>	0,01 М трис-НСI буфер, рН 9,0	0,01 М трис-НСI буфер, рН 9,0	0,02 М трис-НСI + 1,0 % БСА + 1,0 % сахараза + 0,1 % Tween 20 + 0,1 % NaN ₃ , рН 7,6	0,2 М карбонатный буфер + 0,004 М ЭДТА + 1,0 % БСА + 0,1 % NaN ₃ , рН 9,5	[72]
<i>Corynebacterium diphtheriae</i>	0,01 М карбонатный буфер, рН 9,0	0,01 М карбонатный буфер, рН 9,0	0,05 М ФБС, + 0,1 М NaCl + 0,25 % БСА + 0,05 % NaN ₃ , рН 7,4	нет информации	[73]
<i>Burkholderia mallei</i>	0,005 М карбонатный буфер, рН 8,2	0,005 М карбонатный буфер, рН 8,2	0,02 М трис-буфер + 1,0 % сахараза + 1,0 % БСА + 0,02 % Tween 20 + 0,01 % NaN ₃ , рН 7,4	0,02 М ФСБ + 0,05 % Tween 20, рН 8,2	[62]
T2-токсина	0,01 М трис-буфер, рН 9,0	0,01 М трис-буфер, рН 9,0	0,05 М трис-буфер + 1,0 % БСА + 1,0 % сахараза + 0,05 % NaN ₃ , рН 7,5	0,02 М ФСБ + 0,1 % Тритон-Х-100, рН 7,5	[60]
<i>Plasmodium falciparum</i>	0,05 М боратный буфер, рН 7,4	0,05 М боратный буфер + 10 % БСА + 0,5 % Tween 20 + 0,05 % NaN ₃ , рН 7,4	0,05 М боратный буфер + 0,1 % БСА + 0,5 % Tween 20 + 0,05 % NaN ₃ , рН 7,4	0,05 М боратный буфер + 1,0 % БСА + 0,5 % Tween 20 + 0,05 % NaN ₃ , рН 7,4	[74]
Примечания: 1. БР – буферный раствор. 2. ФСБ – фосфатно-солевой буфер. 3. АТ – антитела. 4. БСА – бычий сывороточный альбумин					

Анализ данных научных статей подтверждает влияние состава, сочетания буферных растворов, их рН на наличие или отсутствие неспецифической сорбции конъюгата в тестовой зоне, а также на чувствительность создаваемой тест-системы [60, 62, 72-74].

1.6.5 Определение состава мультимембранного композита

Иммунохроматографическая тест-система – мультимембранный комплекс, состоящий из: мембраны для конъюгата, на которую нанесен комплекс МкАТ с маркером; нитроцеллюлозной мембраны с иммобилизованными МкАТ и АвАТ, соответственно, в тестовой и контрольной зонах; мембраны для образца и адсорбирующей мембраны (рисунок 2).

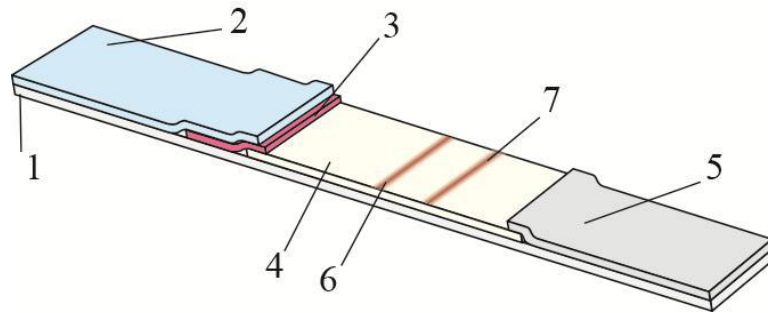


Рисунок 2 – Схематичное изображение иммунохроматографической тест-системы: 1 – пластиковая подложка, 2 – мембрана для пробы, 3 – мембрана для конъюгата маркера с антителами, 4 – рабочая мембрана, 5 – адсорбирующая мембрана, 6 – тестовая зона, 7 – контрольная зона с антивидами антителами [71]

Выбор рабочей мембраны, на поверхности которой происходит образование иммунных комплексов, влияет на чувствительность и специфичность разрабатываемой тест-системы.

В работе Урусова А.Е. и соавт. [94], которая посвящена особенностям разработки иммунохроматографической тест-системы для детекции афлотоксина Б1, были оценены 12 видов рабочих мембран двух наиболее распространенных фирм-производителей мембран для ИХА: «Millipore» (США) и «MDI» («Advanced Microdevices», Индия), различающихся скоростью латерального потока. Результаты экспериментов показали, что увеличение скорости потока конъюгата НчКЗ с МкАТ приводит к повышению специфичность, сокращению длительности анализа, но в разы снижает предел обнаружения возбудителя.

Из данных, представленных в статье, следует, что мембрана «CNPC15» («MDI», Индия) оказалась оптимальной для детекции афлатоксина Б1 (микотоксин), потому что при её использовании достигалась максимальная интенсивность

окраски тестовой и контрольной зон. Предел обнаружения афлатоксина B1 при визуальной детекции составил 1 нг афлатоксина на 1 мл тестируемой пробы [94].

Проанализировав данные научных статей, мы пришли к выводу, что чаще всего при разработке иммунохроматографических тест-систем используют мембраны фирмы «MDI» (авторы 11 из 17 статей предпочли данную фирму) [56, 59, 60, 62, 72-75, 88, 94, 95].

К основным характеристикам мембран для иммунохроматографии относятся скорость латерального потока и размер пор. Среди мембран фирмы «MDI» для конструирования тест-систем чаще других используют мембраны «CNPF10» со скоростью латерального потока 4 см за 125 с и диаметром пор 10 мкм или «CNPC15» со скоростью латерального потока 4 см за 100 с и размером пор 15 мкм [72]. Среди мембран фирмы «Millipore» – «HF240» со скоростью латерального течения – 4 см за 240 с или «HF120» со скоростью латерального течения – 4 см за 120 с [60, 94].

Среди мембран для нанесения конъюгата лидерами являются мембраны фирмы «MDI» – «PT-R5» [62, 75], «PT-R7» [60, 72].

1.7 Актуальность разработки иммунохроматографической тест-системы для выявления *Helicobacter pylori*

Инфекция, вызываемая *H. pylori*, относится к широко распространенным как в России, так и во всем мире. Согласно литературным источникам, хеликобактериоз встречается у 90,0 % жителей Азии и Африки, от 40,0 до 80,0 % населения Восточной Европы и Южной Америки и у 25-40 % населения развитых стран Европы и Северной Америки. Среди взрослого населения Российской Федерации распространенность заболевания достигает 84,0 % [3].

К нозологическим формам, ассоциированным с бактериями *H. pylori* относятся хронический гастрит (частота ассоциации 70,0-80,0 %), язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки и желудка (50,0-60,0 %), MALT-лимфома желудка (до 90,0 %) [6].

Согласно рекомендациям Азиатско-Тихоокеанского консенсуса по раку желудка в популяциях с высоким риском рака желудка необходимо проводить скрининг лиц, инфицированных *H. pylori* [7]. На рисунке 3 представлена диаграмма, на которой визуализируется частота взаимосвязи заболеваний желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) с *H. pylori* и развития онкологических процессов на фоне соответствующих заболеваний [8].

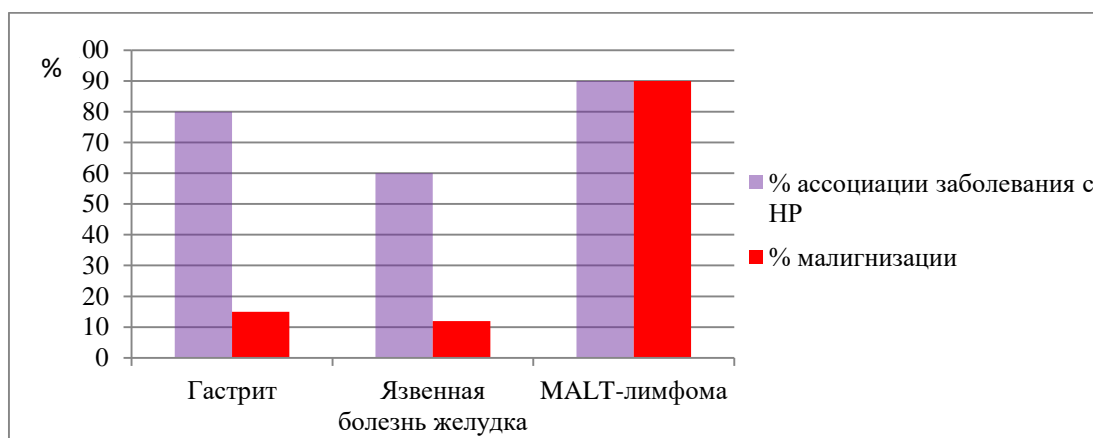


Рисунок 3 – Частота ассоциации заболеваний желудочно-кишечного тракта с *H. pylori* и развития онкологии на фоне соответствующих заболеваний

Согласно докладу Московского научно-исследовательского онкологического института им. П. А. Герцена «Состояние онкологической помощи населению России в 2018 г.» около 625 тыс. новых случаев заболевания раком зарегистрировано в России за 2018 г., 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 % [10]. Распространенность злокачественных заболеваний желудка в России за 2008-2018 гг. представлена на рисунке 4. Статистика смертности от рака желудка в России за 2008-2018 гг. представлена на рисунке 5.



Рисунок 4 – Распространенность злокачественных заболеваний желудка на 100 000 населения в России за 2008-2018 гг.

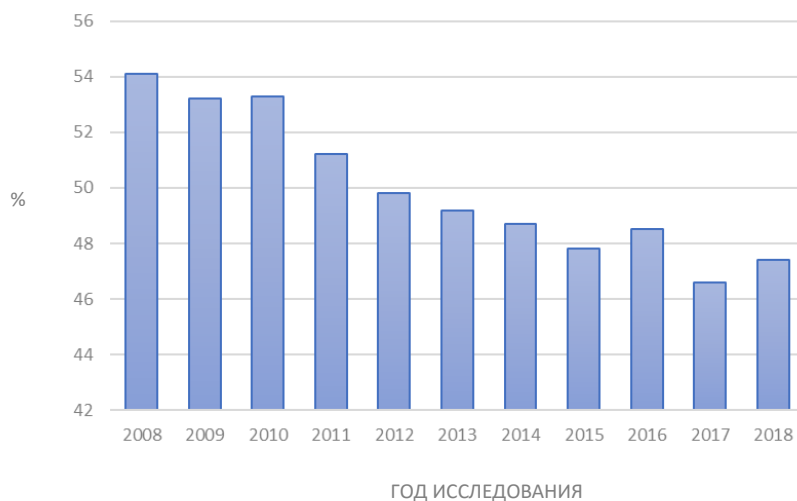


Рисунок 5 – Летальность больных в течение года с момента установления диагноза злокачественного новообразования желудка (из числа больных, впервые взятых на учет в предыдущем году) в России в 2008-2018 гг. [10]

Все вышеперечисленное определяет необходимость внедрения стратегии скрининга и эрадикации *H. pylori*.

В последнее время широкую популярность приобретают экспресс-методы диагностики инфекционных заболеваний, к числу которых относится иммунохроматографический анализ [7]. В настоящее время в России отсутствуют иммунохроматографические тест-системы для выявления антигена CagA *H. pylori* отечественного производства, имеются лишь зарубежные аналоги, не позволяющие дифференцировать бактерии по уровню патогенности (таблица 6).

Таблица 6 – Оснащенность Российского рынка иммунохроматографическими тест-системами для диагностики хеликобактериоза

Название тест-системы	Специфические компоненты
«ImmunoCard STAT HpSA» («Meridian Bioscience», Inc., США)	Моноклональные антитела к антигену <i>H. pylori</i>
Хелико Стик» , Израиль)	Моноклональные антитела к уреазе
«SD BIOLINE <i>H. pylori</i> Ag» («Standard Diagnostics, Inc.», Республика Корея)	Моноклональные антитела к антигену <i>H. pylori</i>
Тест» («Novamed», Израиль)	Моноклональные антитела к антигену <i>H. pylori</i>
«РЭД <i>Helicobacter pylori</i> » «РЭД», Россия)*	Моноклональные антитела к антигену <i>H. pylori</i>
Примечание – «*» – состоит из импортных иммунохимических компонентов, собирается в России	

Ограниченность оснащения рынка тест-системами, направленными на диагностику хеликобактериоза, отсутствие отечественных аналогов, определяют актуальность работы, направленной на создание иммунохроматографической тест-системы. Особенно актуальна разработка тест-системы, направленной на детекцию патогенного белка CagA *H. pylori*. Использование таковой для выявления пациентов, инфицированных высокопатогенными штаммами *H. pylori*, позволит проводить отбор лиц для обоснованного назначения эрадикационной терапии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ, РЕАГЕНТЫ, ОБОРУДОВАНИЕ, МЕТОДЫ

2.1 Материал

2.1.1 Биологический материал для исследования

Штаммы *Helicobacter pylori*, выделенные из зубодесневых карманов, кала и биопсийного материала лиц, имеющих в анамнезе гастрит или язвенную болезнь желудка.

Штамм *Proteus vulgaris* из коллекции культур кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «ВятГУ».

Антигенный препарат «AGHPY-0100» («Arista Biologicals», США), представляющий собой внутриклеточные белки *H. pylori*, ассоциированные с генами *cagA* (120 kd), *vacA* (87 kd), и уреазу.

2.1.2 Материал для разработки иммунохроматографической тест-системы

Мембраны и фильтры: нитроцеллюлозные мембраны «Hi Flow Plus Membrane Card»: 90, 135, 240 («Millipore», США); нитроцеллюлозные мембраны «TYPE-CNPF-SN12-L2-P25» 8μ и 10μ («MDI», Индия); мембраны для нанесения образцов «TYPE-GFB-R4(0.35)» («MDI», Индия); мембраны из стекловолокна для конъюгата «PT-R5» («MDI», Индия); мембраны для абсорбента «TYPE-AP 045» («MDI», Индия), шприцевые фильтрующие насадки «Millex» («Millipore», США).

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).

2.2 Реактивы

В работе использовали реактивы отечественного и зарубежного производства, соответствующие квалификации чистоты «осч», «хч», «чда»: соляную кислоту HCl («Реахим», Россия, ГОСТ 3118-77); азотную кислоту HNO₃ («Реахим», Россия, ГОСТ 4461-77); спирт этиловый 96,0 % C₂H₅OH (ГОСТ 5962-67); 5,0 % раствор перекиси водорода («ЮжФарм», Россия); генциановый фиолетовый (НИЦФ, Россия); раствор Люголя (НПО «Эквус», Россия); фуксин Циля («Реахим», Россия); мочевины (NH₂)₂CO («Реахим», Россия); феноловый красный («Реахим», Россия); цитрат натрия Na₃C₆H₅O₇·5,5H₂O («Реахим», Россия); хлорид натрия NaCl («Реахим», Россия); карбонат калия K₂CO₃ («Реахим», Россия); гидрокарбонат натрия NaHCO₃ («Реахим», Россия); дигидрофосфат калия KH₂PO₄ («Panreac», Испания); гидрофосфат натрия Na₂HPO₄ («Sciphos», Китай); тетраборат натрия Na₂B₄O₇ («Реахим», Россия); янтарную кислоту C₄H₆O₄ («Реахим», Россия); трис(гидроксиметил)аминометан C₄H₁₁NO₃ («Sigma», США); трис-гидрохлорид C₄H₁₂ClNO₃ («Panreac», Испания); полиэтиленгликоль (ПЭГ) 40 000 («Sigma», США); бычий сывороточный альбумин («Диа-М», Германия); Tween 20 («AppliChem», Германия); сахарозу («Реахим», Россия); амфотерицин («Синтез», Россия); ванкомицин Б («Красфарма», Россия); лактат серебра CH₃CH(OH)COOAg («Sigma Aldrich», США); гидрохинон C₆H₄(OH)₂ (Россия); агарозу (AppliChem, Германия); буфер ТВЕ (Россия); бромистый этидий («VWR Life Science AMRESCO», США); золотохлористоводородную кислоту HAuCl₄·3H₂O («Sigma», США); карбонат натрия Na₂CO₃ («Химреактив», Россия); натрий углекислый кислый NaHCO₃ («Вектон», Россия); трилон Б («Векос», Россия); («БиолоТ», Россия), фурациллин («Татхимфармпрепараты», Россия).

2.3 Питательные среды

Колумбийский агар («Oxoid LDT», Англия); эритроциты барана («ЭкоЛаб», Россия); транспортная среда («БиолоТ», Россия).

2.4 Тест-системы

В работе использовали следующие коммерческие 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*; тест-системы «Хеликопол СА», «Хеликопол ВА», «Хеликопол ІА», «Хеликопол ВА» для определения наличия генов, соответственно, *cagA*, *vacA* *iceA*, *babA* («Литех», Россия); набор для выделения ДНК («Литех», Россия); комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК *Helicobacter pylori* в режиме реального времени («ДНК-технологии», Россия); набор для ДОТ-анализа «Хелико-экспресс» («Вектор-бест», Россия); тест-систему для определения оксидазной активности «OXI test» («Erba LACHEMA», Чехия).

2.5 Лабораторная посуда

Чашки Петри ТУ 9443-004-16548645-00 («ПАО Стеклоприбор», Россия); шпатель Дригальского из стекла ХС-3 («КлинСтек», Россия); мерные колбы объемом 250, 500, 750, 1000 мл («Минимед», Россия); мерные цилиндры объемом 1000, 250, 150, 25 мл ГОСТ 1770-74Е («Минимед», Россия); пробирки лабораторные стеклянные ГОСТ 1770-74 («КлинСтек», Россия); предметные стекла («Новолаб», Россия); колбы Эрленмейера («Минимед», Россия); дефлегматор («АгатМед», Россия); пробирки объемом 1,5 мл типа эппендорф («Eppendorf», Германия); одноканальные пипетки с переменным объемом («НТЛ», Польша); 96-луночные плоскодонные полистироловые планшеты («Greinerbio-one», Германия); стерильные шприцы (Россия); кюветы спектрофотометрические («Литопласт-Мед», Республика Беларусь); пластиковые пробирки объемом 15 мл («МиниМед», Россия).

2.6 Оборудование

В работе использовали следующее оборудование: электронный трансмиссионный микроскоп «JEM-1011» («Jeol», Япония); спектрофотометр сканирующий «СПЕКС ССП-705-4» (ЗАО «Спектроскопические системы», Россия); центрифугу лабораторную «Avanti J-E» («Beckman Coulter», США); центрифугу-вортекс «Микроспин» («Biosan», Латвия); весы электронные аналитические «Adventurer» («OHAUS», США); холодильник бытовой «Stinol RF-305», Россия); ламинарный шкаф II класса биологической защиты «БАВп-01» («Lamsystems», Германия); термостат «ТСО-1/80 СПУ» (Россия); магнитную плитку («Heidolph», Германия) с магнитами для перемешивания («Hanna Instruments», Германия); резак для бумаги («Rahmenlos® Katze Geschenk Shirt», США); pH-метр pH-410 («Аквилон», Россия); систему для получения деионизированной воды «Arium 611 UF» («Sartorius», Германия); аквадистиллятор электрический «ДЭ-25» («СПб», Россия); микроскоп «Микмед-1» («Биолам», Россия); термостат твёрдотельный программируемый «Гном ТТ-1» («ДНК-технологии», Россия); амплификатор для проведения ПЦР-анализа 4-х канальный П4-ПЦР-01 «Терцик» («ДНК-технологии», Россия); камеру для электрофореза горизонтальную «Mini-Sub Gell GT» («BioRad», США); источник питания «PowerPac HV» («BioRad», США); амплификатор для Real-time ПЦР «ДТ-322» («ДНК-технологии», Россия); трансиллюминатор «ECX-15 M» («Vilber Lourmat», Франция); микроволновую печь «Inverter» («Panasonic», Япония); дозатор одноканальный с переменным объемом 100-1000 мкл «VE1000XR» («HIGH TECH LAB», Польша); дозатор одноканальный с переменным объёмом 20-200 мкл «VE200» («HIGH TECH LAB», Польша); дозатор одноканальный с переменным объемом 10-100 мкл «VE100» («HIGH TECH LAB», Польша); дозатор одноканальный с переменным объемом 2-20 мкл «VE20» («HIGH TECH LAB», Польша); дозатор одноканальный с переменным объемом 0.5-10 мкл «VE10» («HIGH TECH LAB», Польша); наконечники на 1000 мкл («CITOTEST LABWARE MANUFACTURING CO», Китай); наконечники на 200 мкл («Ulplast», Польша); наконечники на 10 мкл («Ulplast», Польша); спектрофотометр «SpectraMax Plus 384» («Molecular devises», США).

2.7 Методы

2.7.1 Приготовление растворов

Все растворы готовили в химически чистой посуде на деионизированной воде.

Для получения 0,025 М сукцинатно-боратного буфера (СББ) с рН 9,0 готовили 0,025 М раствор тетрабората натрия ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$), растворяя навеску массой 0,125 г в 25 мл деионизированной воды, и 0,025 М раствор янтарной кислоты ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_4$), растворяя навеску массой 0,03 г в 10 мл деионизированной воды. Доводили значение рН до 9,0, добавляя раствор янтарной кислоты к раствору тетрабората натрия. Полученный раствор фильтровали через шприцевую насадку с размером пор 0,22 м.

Для приготовления рабочего 0,25 М Трис-буфера с рН 9,0, используемого для разведения МкАТ, готовили 0,025 М раствор трис-аминометана ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$), растворяя навеску массой 0,12 г в 40 мл деионизированной воды, и 0,025 М раствор трис-гидрохлорида ($\text{C}_4\text{H}_{12}\text{ClNO}_3$), растворяя 0,197 г в 50 мл деионизированной воды. Доводили значение рН до 9,0, добавляя 0,025 М раствор трис-гидрохлорида к 0,025 М раствору трис-аминометана. Полученный раствор фильтровали через шприцевую насадку с размером пор 0,22 м.

Для приготовления стабилизирующего буфера 0,025 М Трис-буфера с рН 8,5 20 мл 0,025 М Трис-буфера с рН 9,0 доводили 0,025 М раствором трис-гидрохлорида до рН 8,5. В 20 мл 0,025 М Трис-буфера вносили 0,2 г сахарозы до конечной концентрации 1,0 %, фильтровали, 20 мкл Tween 20 до конечной концентрации 0,1 % и 0,2 г БСА до конечной концентрации 1,0 %.

Для получения 4,0 % раствора ПЭГ навеску массой 0,2 г растворяли в 5 мл деионизированной воды. Полученный раствор фильтровали через шприцевую насадку с размером пор 0,22 м.

Для приготовления 0,1 М карбоната калия (K_2CO_3) навеску массой 0,69 г растворяли в 50 мл деионизированной воды. Полученный раствор фильтровали через шприцевую насадку с размером пор 0,22 м.

Для приготовления 0,05 М тетрабората натрия ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7$) навеску массой 0,5 г растворяли в 50 мл деионизированной воды. Полученный раствор фильтровали через шприцевую насадку с размером пор 0,22 μ .

Для приготовления буфера разгона готовили 0,01 М раствор трис-аминометана, растворяя навеску массой 0,024 г в 20 мл деионизированной воды, и 0,01 М раствор трис-гидрохлорида, растворяя навеску массой 0,078 г в 50 мл деионизированной воды. Доводили pH буфера разгона до 7,5, добавляя раствор 0,01 М трис-гидрохлорида к 0,01 М раствору трис-аминометана. Далее в раствор добавляли NaCl до концентрации 1 М. Полученный буфер фильтровали через шприцевую насадку с размером пор 0,22 μ и вносили в готовый раствор Tween 20 до конечной концентрации 0,1 %.

Для приготовления 0,5 М цитратного буфера с pH 4,0 готовили 0,05 М раствор цитрата натрия ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5,5 \text{H}_2\text{O}$), растворяя навеску массой 3,53 г в 20 мл деионизированной воды, и 0,5 М раствор лимонной кислоты ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), растворяя 0,96 г лимонной кислоты в 10 мл деионизированной воды. Доводили pH до 4,0, добавляя 0,5 М раствор лимонной кислоты в 0,5 М раствор цитрата натрия. В раствор вносили гидрохинон ($\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2$) до конечной концентрации 3,0 %. Полученный раствор фильтровали через шприцевую насадку с размером пор 0,22 μ .

2.7.2 Приготовление питательной среды

Для приготовления питательной среды навеску колумбийского агара массой 3,9 г растворяли в 100 мл дистиллированной воды. Питательную среду стерилизовали автоклавированием острым паром при температуре 121 °C под давлением 1,1 атм в течение 20-25 мин. Среду охлаждали до температуры 45 °C, после чего в нее добавляли навески антибиотиков амфотерицина и ванкомицина Б массой 30 мкг и 5 мл стерильной крови комнатной температуры. Питательную среду тщательно и аккуратно перемешивали, не допуская образования пузырьков, и разливали в чашки Петри. После охлаждения питательной среды до комнатной температуры чашки со средой хранили при температуре 4-5 °C в холодильнике.

2.7.3 Забор и подготовка биологического материала к посеву

Забор биологического материала из зубодесневых карманов добровольцев осуществляли с помощью стерильных штифтов, представляющих собой зубочистки с ватными концами. Перед забором материала каждый доброволец проводил полоскание полости рта раствором фурациллина. Материал отбирали из зубодесневых карманов маляров и резцов, затем его ресуспендировали в 1,0 мл 0,9 % растворе хлорида натрия и проводили высев на питательную среду.

Биопсийный материал слизистой желудка помещали в предварительно пронумерованные пробирки типа эппендорф с транспортной средой «БиолоТ» и доставляли в лабораторию. Перед посевом его гомогенизировали, растирая в стерильной ступке с 1,0 мл 0,9 % раствора хлорида натрия.

Кал отбирали в стерильные баночки для сбора анализов. Перед посевом 200 мг материала гомогенизировали в 1,8 мл 0,9 % раствора хлорида натрия. Взвеси давали отстояться при комнатной температуре 10-15 мин, затем 0,1 мл суспензии переносили в следующую пробирку с 9,9 мл физиологического раствора, получая рабочее разведение материала, которое высевали на селективную питательную среду.

2.7.4 Микробиологические методы

H. pylori культивировали на селективной питательной среде – колумбийском кровяном агаре с антибиотиками амфотерицином и ванкомицином Б.

На стерильные и промаркированные чашки Петри с колумбийским агаром, кровью и антибиотиками высевали 0,1 мл материала, ставили в эксикатор для обеспечения микроаэрофильных условий (5,0 % O₂, 5,0-10,0 % CO₂, 85,0-90,0 % N₂) [96]. Посевы инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение 3-5 суток.

Идентификацию *H. pylori* проводили на третьи сутки по характерным морфологическим критериям – образованию на плотной питательной среде непрозрачных, выпуклых колоний размером 0,5-2 мм, похожих на капли росы, при сплошном росте колонии сливаются в глянцевую пленку [1].

Методом микроскопии оценивали мазки, окрашенные по Граму. Приготовление микробиологических препаратов для микроскопии осуществляли следующим образом. На чистое обезжиренное предметное стекло наносили каплю физиологического раствора хлорида натрия. Прокаленной над пламенем спиртовки бактериологической петлей с поверхности питательной среды брали небольшое количество микробной культуры и вносили ее в каплю раствора натрия хлорида. С помощью бактериологической петли материал тщательно распределяли равномерным тонким слоем по поверхности стекла на площади около 4 см². Мазок подсушивали на воздухе и фиксировали, трехкратно проводя предметное стекло с мазком через верхнюю часть пламени спиртовки [97].

Далее окрашивали мазок по методу Грама. Для этого на приготовленный мазок накладывали кусочек фильтровальной бумаги и наносили краситель карболовый генциановый фиолетовый на 2 мин. Краситель сливали и, не промывая препарат водой, заливали мазки на 2 мин раствором Люголя. Раствор Люголя сливали и промывали препарат 96,0 % этиловым спиртом до обесцвечивания. После этого препарат промывали дистиллированной водой и дополнительно окрашивали в течение 2 мин водным раствором фуксина. Краситель сливали, препарат промывали водой, сушили. Микроскопию готового мазка проводили, используя иммерсионное масло и объектив·90 [97, 98].

Биохимическую идентификацию проводили, используя уреазный, оксидазный и каталазный тесты.

Для постановки уреазного теста готовили 0,1 % спиртовой раствор фенол-рота (индикатор) и 10,0 % раствор мочевины. Для приготовления 0,1 % спиртового раствора фенол-рота 2,4 мл 96,0 % спирта разводили в 9,6 мл дистиллированной воды. Затем навеску фенол-рота массой 0,12 г растворяли в 12 мл полученного спиртового раствора. Для приготовления 10,0 % раствора мочевины 0,6 г мочевины растворяли в 6 мл дистиллированной воды, после чего в раствор добавляли 2 капли (40 мкл) индикатора, получая рабочий раствор.

В лунки стерильного планшета вносили по 40 мкл рабочего раствора. В каждую лунку бактериологической петлёй вносили культуру *H. pylori*. Планшет закрывали и инкубировали в термостате при температуре 37 °С в течение суток.

При наличии *H. pylori* цвет индикатора в лунке планшета менялся с малинового на жёлтый, в зависимости от степени активности уреазы, интенсивность окрашивания была различной.

Для определения активности цитохромоксидазы *H. pylori* использовали тест-систему «Охi-тест». На индикаторную полоску в зону индикации наносили сначала каплю реактива, входящего в состав набора, а затем в неё втирали исследуемую культуру бактериологической петлёй. Результат учитывали в течение 1 мин. При наличии цитохромоксидазы зона индикации становилась синей в результате окисления N,N-диметил-1,4-фенилендиамина железом цитохрома.

Для определения каталазной активности на обезжиренное предметное стекло наносили 2-3 капли 5,0 % перекиси водорода, затем в каплю вносили исследуемую культуру. О наличии каталазной активности культуры свидетельствует образование пузырьков газа [99].

2.7.5 Молекулярно-генетическая идентификация

Выделение ДНК. К 0,5 мл суспензии клеток *H. pylori* с концентрацией $1 \cdot 10^9$ м.к.·см⁻³, содержащейся в эппендорфе, добавляли 50 мкл лизирующего раствора (Трис-ОН, ЭДТА, SDS) и хорошо перемешивали в течение 15 с на вортексе. Смесь инкубировали при температуре 90 °С в течение 10 мин в термостате «Гном». Затем смесь перемешивали на вортексе в течение 5 с, откручивали для сброса капель с поверхности крышки. В пробирки добавляли по 250 мкл 3 М раствора ацетата натрия и перемешивали на вортексе в течение 5 с. Пробирки со смесью центрифугировали при 12000 об·мин⁻¹ в течение 30 с при температуре 25 °С. Супернатант отбирали пипеткой и переносили в пробирки с 1 г йодистого натрия (1 г йодистого натрия на 1 пробу) и сразу же вносили 25 мкл 20,0 % диатомовой суспензии.

Смесь перемешивали на вортексе 1-2 мин, инкубировали при комнатной температуре 5 мин, затем снова перемешивали на вортексе в течение 5 с. Содержимое пробирок центрифугировали при $12000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$ в течение 30 с при температуре $25 \text{ }^\circ\text{C}$, супернатант удаляли с помощью стеклянного наконечника в колбу-ловушку, подключённую к насосу. Осадок промывали дважды 70,0 % раствором этанола и один раз ацетоном следующим образом: 1 мл соответствующего раствора вносили в пробирку, встряхивали на вортексе в течение 5 с, центрифугировали при температуре $25 \text{ }^\circ\text{C}$ при $12000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$ в течение 30 с и удаляли супернатант с помощью стеклянного наконечника в колбу – ловушку. После промывания спиртовым раствором и ацетоном осадок высушивали в термостате при температуре $56 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 10 мин, открыв крышки эппендорфов. К высушенному осадку добавляли 100 мкл буфера TE (смесь трис-аминометана и ЭДТА) и ресуспендировали на вортексе в течение 5 с. Пробирки с содержимым повторно инкубировали при $56 \text{ }^\circ\text{C}$ в течение 10 мин, встряхивая 4 раза в течение 5 с в процессе инкубирования. После нагревания осадок хорошо перемешивали на вортексе в течение 5 с и центрифугировали при $12000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$ в течение 30 с при температуре $25 \text{ }^\circ\text{C}$. Супернатант, содержащий раствор ДНК, отбирали пипеткой и переносили в чистую пробирку.

Методика постановки Real-time-ПЦР. В промаркированные пробирки со смесью для амплификации вносили по 10 мкл тщательно перемешанного раствора Taq-полимеразы, учитывая пробирки для отрицательного контрольного образца (К) и положительного образца (К⁺). Затем добавляли по 7 мкл минерального масла и по 5 мкл образцов ДНК (во все пробирки, кроме К⁻ и К⁺). В пробирку К⁻ добавляли 5 мкл деионизированной воды, а в пробирку К⁺ вносили 5 мкл положительного контроля из комплекта. Все пробирки центрифугировали при $1000 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$ в течение 3-5 с, а затем переносили в амплификатор. Устанавливали программу в соответствии с таблицей 7.

Таблица 7 – Программа амплификации для амплификаторов ДТ-322 и ДТ-96 [100]

№ блока	Температура амплификации, °С	Время амплификации, с	Число циклов амплификации, шт.
1	80,0	30	1
	94,0	90	
2	94,0	30	5
	64,0	15	
3	94,0	10	45
	64,0	15	
4	94,0	5	1
5	10	∞	хранение

Детекцию продуктов амплификации осуществляли с помощью ДНК-зондов, меченных флуоресцентной меткой FAM, результаты амплификации отражались на мониторе компьютера. Длина продукта амплификации ДНК *H. pylori* составляет 348 п.н.

Методика определения генов патогенности у идентифицированных штаммов *H. pylori*. Определение генов патогенности проводили путем постановки ПЦР. Методику осуществляли в ламинарном шкафу, который перед работой стерилизовали путём ультрафиолетового облучения в течение 15 мин. Все рабочие поверхности в боксе, а также перчатки обрабатывали 70,0 % раствором этанола.

Пробирки маркировали по числу образцов исследуемых ДНК с учётом пробирок для отрицательного K⁻ и положительного K⁺ контролей. Все реактивы тщательно встряхивали на вортексе (кроме буфера), осаждали на миницентрифуге в течение 5-10 с при комнатной температуре. Для каждой смеси праймеров готовили отдельные премиксы (таблица 8).

Таблица 8 – Расчет премикса на 1 образец [86]

Компонент премикса	Объем, мкл
Вода деионизированная	7,15
ПЦР-буфер	1,5
Раствор дНТФ (динуклеотидтрифосфатов)	1,5
MgCl ₂	1,25
Смесь праймеров cagA/vacA (s1/s2)/vacA(m1)/vac A(m2)/babA/ice A1/ ice A2	1
Тақ-полимераза	0,1

Полученные премиксы перемешивали на вортексе и вносили в промаркированные пробирки типа эппендорф по 12,5 мкл. В пробирки добавляли 2,5 мкл исследуемого образца ДНК, в пробирку K⁺ вносили 2,5 мкл контрольной ДНК *H. pylori* в качестве положительного контроля, а в пробирку K⁻ – 2,5 мкл деионизированной воды в качестве отрицательного контроля. Пробирки встряхивали на вортексе, затем центрифугировали. Во все пробирки аккуратно по стенке вносили 15 мкл вазелинового масла и центрифугировали.

На амплификаторе устанавливали необходимый режим в зависимости от используемого набора (таблица 9). Камеры амплификатора прогревали до 93 °С, устанавливали объём реакционной смеси 25 мкл. Пробирки помещали в камеры амплификатора. Продолжительность ПЦР-амплификации – 3 ч 50 мин.

Таблица 9 – Режимы амплификации для наборов «Хеликопол» [101]

Режимы амплификации для наборов					
«Хеликопол СА, VA, IA»			«Хеликопол ВА»		
t, °С	время, мин	циклы, шт	t, °С	время, мин	циклы, шт
94	0		94	0	
94	1	1	94	1	1
94	1	35 (IA – 40)	94	1	35
52	1		55	1	
72	2		72	1	
72	5	1	72	5	1
10	∞	-	10	∞	-

Примечание – «0» – пауза перед началом работы

Детекция продуктов амплификации. Для разделения продуктов амплификации проводили гель-электрофорез ДНК в 1,0 % агарозном геле. Для этого ячейку для электрофореза закрепляли на специальном столике, вставляли в ячейку гребёнку. Навеску агарозы массой 0,45 г растворяли в 27 мл дистиллированной воды, затем расплавляли полученный раствор в течение 45 с в микроволновой печи. Расплавленную агарозу охлаждали до 50-60 °С и добавляли 3 мл буфера TBE*5. Полученный гель заливали в ячейку с гребёнкой. После того, как гель полимеризовался, ячейку переносили в камеру для фореза. В камеру заливали буфер TBE*1 так, чтобы кармашки геля были полностью закрыты уровнем жидкости. Гребёнку доставали, смешивали объёмы образца ДНК с краской в соотношении 5:2,5. В кар-

машки геля вносили смешанные с краской образцы ДНК, положительный контроль, отрицательный контроль и маркёры. Подключали камеру для фореа к источнику питания и устанавливали напряжение 60-80 В. Форез заканчивали, когда полоска красителя немного не доходила до края геля (1,5-2 см). Затем гель прокрашивали в кювете с бромистым этидием в течение 5-10 мин в темноте при комнатной температуре и анализировали в трансиллюминаторе.

2.7.6 Методика тестирования сыворотки крови на наличие антител к белку CagA *Helicobacter pylori*

Тестирование сыворотки крови на наличие антител к белку CagA *Helicobacter pylori* проводили, используя тест-систему «Хелико-экспресс». Тест-система представляет собой нитроцеллюлозную мембрану с сорбированным рекомбинатным антигеном CagA *H. pylori* и белком А, упакованную в пластмассовый корпус с фильтром для крови. В набор включен инактивированный положительный контрольный образец (К+); инактивированный слабоположительный контрольный образец (К±); отрицательный контрольный образец (К-); белок А, конъюгированный с НчКЗ; раствор для разведения образцов (РРО); раствор для разведения конъюгата (РРК) и отмывающий раствор (ОР).

Перед проведением анализа все компоненты тест-системы доставали из холодильника и выдерживали 30 мин при комнатной температуре.

Рабочее разведение конъюгата готовили за 15 мин до проведения анализа, смешав РРК и конъюгат в необходимом количестве, согласно таблице 10.

Таблица 10 – Схема получения РРК

Реагент	Необходимое количество реагентов, в зависимости от количества анализов, для получения рабочего разведения конъюгата, мкл												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
Конъюгат	10	15	20	25	30	40	45	50	55	60	70	75	80
РРК	40	60	80	100	120	160	180	200	220	240	280	300	320

Для приготовления исследуемых (контрольных) образцов, к каждому образцу, объемом 30 мкл, добавляли 30 мкл РРО, перемешивали пипетированием и выдерживали не менее 5 мин при комнатной температуре.

Контрольные образцы (K⁺, K[±], K⁻) тестировались только при первом использовании данного набора.

Анализ проводили в следующей последовательности:

1. Из коробки извлекали необходимое для анализа число тест-систем.
2. 4 капли ОР наносили на фильтры с помощью флакона-капельницы, ждали полного протекания раствора.
3. В центры фильтров наносили исследуемый образец сыворотки по 10 мкл 4 раза.
4. После полного протекания образца на фильтры наносили 4 капли ОР.
5. Удаляли фильтры из отверстий кассет.
6. В отверстия кассет вносили 4 капли ОР.
7. После полного протекания ОР в отверстия кассет вносили пипеткой 3 раза по 10 мкл рабочего разведения конъюгата
8. После полного протекания раствора конъюгата в отверстия кассет вносили 4 капли ОР.

Результат тестирования оценивали визуально спустя 10 мин после окончания анализа. Его принимали за положительный, если в отверстия кассеты образовался знак «+», за отрицательный, если в отверстия кассеты образовался знак «-». Отсутствие в отверстия кассеты какого-либо знака указывало на ошибку проведения анализа.

2.7.7 Статистические методы

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.» [102]. 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 [103]. В случаях ограничения применения критерия χ^2 использовался точный критерий Фишера [104]. 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 ассиметричного (направленного) критерия d Сомера [105]. Статистический анализ выполнен с применением программных пакетов «Microsoft Office Excel», «Statistica 10.0» и «WinBUGS 1.4.0.».

ГЛАВА 3. ВЫДЕЛЕНИЕ И ИДЕНТИФИКАЦИЯ ШТАММОВ

Helicobacter pylori

3.1 Выделение культур *Helicobacter pylori* из биологического материала добровольцев

Для выделения культур *H. pylori* был использован биологический материал от 12 пациентов – добровольцев с хроническими заболеваниями желудка и двенадцатиперстной кишки, из них 4 женщины и 8 мужчин, средний возраст пациентов составил 50 ± 2 г. 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 Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000 г.). У каждого пациента был проведён забор биологического материала из зубодесневых карманов, а также из слизистой оболочки антрального отдела желудка.

Забор биологического материала из зубодесневых карманов, биопсийного материала слизистой оболочки желудка и пробоподготовку проводили в соответствии с п. 2.7.3.

Посев 0,1 мл каждого биологического материала осуществляли на селективную питательную среду с колумбийским кровяным агаром и антибиотиками (амфотерицином и ванкомицином Б).

Выделение чистых культур *H. pylori* и их идентификацию проводили в соответствии с пунктом 2.7.4.

Таким образом, от 12 добровольцев получили 24 пробы, соответствие номеров проб биологического материала номерам добровольцев представлено в таблице 11.

Таблица 11 – Соответствие номеров проб биологического материала номерам добровольцев

№ добровольца	Номера проб биологического материала	
	из зубодесневых карманов	со слизистых оболочек желудков
1	1з	1б
2	2з	2б
3	3з	3б
4	4з	4б
5	5з	5б
6	6з	6б
7	7з	7б
8	8з	8б
9	9з	9б
10	10з	10б
11	11з	11б
12	12з	12б

3.2 Идентификация штаммов *Helicobacter pylori*

3.2.1 Микробиологическая идентификация

Засеянные чашки с материалом анализировали через 3-5 суток. За *H. pylori* принимали культуры, образующие на селективной питательной среде характерный рост в виде глянцевых диаметром 1-2 мм колоний правильной округлой формы с ровными краями (рисунок 6). При микроскопии клетки *H. pylori* имели вид небольших грамотрицательных неспорообразующих слегка изогнутых палочек (рисунок 7).

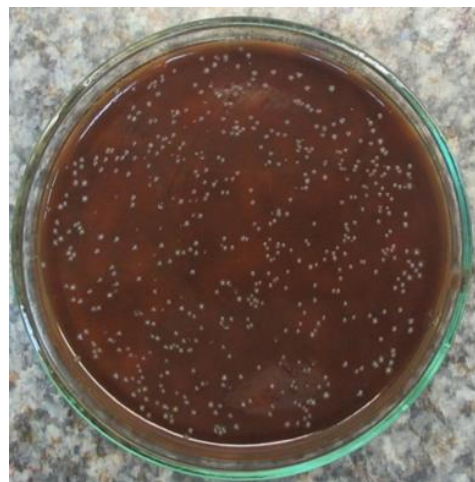


Рисунок 6 – Внешний вид колоний *H. pylori* на колумбийском агаре с эритроцитами

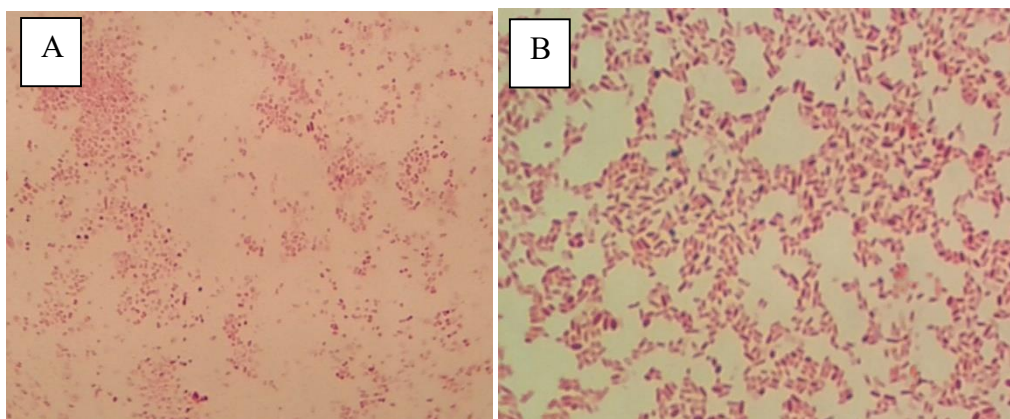


Рисунок 7 – Внешний вид *H. pylori* при просмотре мазков культуры, окрашенных по Граму, под микроскопом, увеличение $\times 1000$. А – культура, выделенная из материала зубодесневого кармана; В – из биоптата

Характерные по морфологическим свойствам колонии *H. pylori* были отобраны для дальнейшей идентификации и получения чистых культур.

Для биохимической идентификации применяли постановку трех тестов – оксидазного, каталазного и уреазного. Результаты микробиологической и биохимической идентификации выделенных культур представлены в приложениях А и Б, а также отображены в сводной таблице 12.

Таблица 12 – Результат микробиологической идентификации штаммов, выделенных из биологического материала, на принадлежность к виду *H. pylori*

№	Результат идентификации биологического материала	
	зубодесневых карманов	слизистой оболочки желудка
1	+	-
2	+	-
3	+	+
4	+	+
5	+	+
6	+	-
7	-	+
8	+	+
9	+	-
10	+	+
11	+	+
12	-	+

Примечания:

- «+» – штамм идентифицирован как *H. pylori*.
- «-» – штамм не идентифицирован как *H. pylori*

По результатам первого этапа микробиологического исследования, включающего морфологическую оценку колоний, микроскопию и биохимические тесты,

были отобраны культуры, предположительно идентифицированные как *H. pylori* (№№ 13-63, 83-113, 36-56, 76, 86, 106-126). С них были сделаны пересевы на колумбийский кровяной агар с последующей повторной идентификацией с использованием всех вышеперечисленных методов.

3.2.2 Молекулярно-генетическая идентификация штаммов

Helicobacter pylori

Постановку полимеразной цепной реакции проводили после получения результатов микробиологического исследования с суспензиями чистых культур *H. pylori*.

Стадии молекулярно-генетической диагностики:

1. Выделение ДНК из чистых культур *H. pylori*.
2. Постановка ПЦР:
 - приготовление реакционных смесей;
 - амплификация (три стадии: денатурация ДНК, отжиг, элонгация).
3. Детекция продуктов амплификации.

Для выделения ДНК из клеток *H. pylori* использовали набор для подготовки проб к анализу методом полимеразной цепной реакции.

Выделенные ДНК хранили при температуре минус 20 °С.

Молекулярно-генетическую идентификацию штаммов *H. pylori* проводили в два этапа:

– идентификация чистых культур, полученных в процессе культивирования биопсийного материала и содержимого зубодесневых карманов, как *H. pylori*;

– генотипирование идентифицированных штаммов *H. pylori* с целью определения генов патогенности – *vacA*, *cagA*, *iceA*, *babA*.

Идентификацию *H. pylori* проводили методом ПЦР в режиме реального времени (Real-time ПЦР) с использованием комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК, в состав которого входят:

- смесь для амплификации, запечатанная парафином;
- раствор Taq-полимеразы;
- минеральное масло;
- положительный контрольный образец (К+).

Принцип ПЦР в режиме реального времени заключается в детекции и учёте результатов исследования при помощи флуоресцентного метода непосредственно в ходе амплификации. В реакционную смесь для амплификации дополнительно вводятся флуоресцентные метки – зонды, представляющие собой цепочку ДНК, комплементарную фрагменту детектируемой ДНК. На одном конце зонда (3'-конце) располагается флуорофор (флуоресцентная молекула), а на другом (5'-конце) – гаситель флуоресценции. Сигнал флуоресценции отсутствует, когда гаситель и флуорофор находятся на близком расстоянии друг от друга. Если в исследуемой пробе имеется детектируемая ДНК, то в процессе амплификации при денатурации ДНК флуоресцентный зонд гибридизируется с комплементарным участком ДНК. В ходе элонгации Taq-полимераза расщепляет зонд, и флуорофор отдаляется от молекулы гасителя и появляется свечение. Детектирующий амплификатор регистрирует появившийся флуоресцентный сигнал, результаты отображаются на мониторе компьютера, к которому подключен прибор [106]. Длина продукта амплификации ДНК *H. pylori* – 348 п.н.

Обобщённые результаты микробиологической и молекулярно-генетической идентификации *H. pylori* представлены в таблице 13.

Из данных, представленных в таблице 14, следует, что при микробиологической диагностике из проб, взятых из зубодесневых карманов, чистая культура *H. pylori* была получена в 10 случаях (83,3 %), из проб биопсийного материала – в 8 случаях (66,7 %).

Таблица 13 – Результаты идентификации *H. pylori* в пробах из зубодесневых карманов и биоптатов бактериологическим и молекулярно-генетическим методом

№ пробы	Результаты идентификации культуры, выделенной из			
	зубодесневых карманов		биопсийного материала слизистой желудка	
	бактериологическим методом	молекулярно-генетическим методом	бактериологическим методом	молекулярно-генетическим методом
1	+	+	Н	Н
2	+	-	Н	Н
3	+	+	+	+
4	+	+	+	+
5	+	+	+	+
6	+	+	Н	Н
7	Н	Н	+	-
8	+	Н	+	+
9	+	-	Н	Н
10	+	-	+	+
11	+	+	+	+
12	Н	Н	+	-

Примечания:

1. «+» – положительный результат идентификации.
2. «-» – отрицательный результат идентификации.
3. «Н» – исследование не проводилось, т.к. микроорганизм не был выделен из биологического материала

Для генотипирования с целью определения генов патогенности были выбраны образцы №№ 1з, 3з, 3б, 4з, 4б, 5з, 5б, 6з, 8б, 10б, 11з, 11б, которые по результатам постановки как бактериологического, так молекулярно-генетического методов были идентифицированы как *H. pylori*.

Определение генов патогенности *H. pylori* осуществляли методом полимеразной цепной реакции с использованием коммерческих тест-систем «Хеликопол СА» (на наличие гена *cag A*), «Хеликопол VA» (*vac A*), «Хеликопол IA» (*ice A*), «Хеликопол BA» (*bab A*).

Результаты ПЦР оценивали методом электрофореза в агарозном геле. Прокрашенный и промытый дистиллированной водой гель переносили на трансиллюминатор и анализировали полученные результаты. Фрагменты анализируемых

ДНК проявлялись в виде светящихся оранжево-красных полос при облучении УФ-излучением с длиной волны 310 нм.

Результат электрофореза учитывали только в том случае, если дорожка, соответствующая кармашку с отрицательным контролем, не содержала светящиеся полосы, то есть микробная контаминация пробы отсутствовала, а дорожка с положительным контролем, содержала только одну полосу.

Дорожки всех исследуемых образцов сравнивали с дорожкой положительного контроля. Отсутствие полосы строго на уровне положительного контроля свидетельствовало об отсутствии ДНК *H. pylori* в анализируемом образце. Наличие полосы, соответствующей полоске положительного контроля говорит о присутствии ДНК возбудителя в образце.

Размеры фрагментов ДНК *H. pylori* в образцах, соответствующие полосе положительного контрольного образца, представлены в таблице 14.

Таблица 14 – Размер фрагментов ДНК возбудителя *H. pylori* в образцах, соответствующий фрагменту положительного контрольного образца [48]

Набор	Ген <i>H. pylori</i>	Полоса положительного контроля, п.н.
«Хеликопол СА»	<i>cagA</i>	404
«Хеликопол ВА»	<i>vacA</i>	<i>vacA s1</i> : 259 <i>vacA s2</i> : 286 <i>vacA m1</i> : 290 <i>vacA m2</i> : 352
«Хеликопол ВА»	<i>babA</i>	800
«Хеликопол ІА»	<i>iceA</i>	<i>iceA1</i> : 250 <i>iceA2</i> : 334

Результаты молекулярно-генетической идентификации штаммов *H. pylori* представлены в таблице 15.

Таблица 15 – Результаты генотипирования чистых культур *H. pylori*, полученных из биологического материала зубодесневых карманов и биоптатов [107]

№ пробы	Генотип чистой культуры <i>H. pylori</i> , выделенной из	
	материала зубодесневых карманов	биоптатов
1з	<i>cagA</i> ⁺ <i>vacA</i> ⁺ (<i>s1</i> ⁺ <i>m1</i> ⁺ <i>s2</i> ⁻ <i>m2</i> ⁺)	Н
3з; 3б	<i>cagA</i> ⁻ <i>vacA</i> ⁺ (<i>s1</i> ⁺ <i>m1</i> ⁺ <i>s2</i> ⁻ <i>m2</i> ⁺)	<i>cagA</i> ⁻ <i>vacA</i> ⁺ (<i>s1</i> ⁻ <i>m1</i> ⁻ <i>s2</i> ⁻ <i>m2</i> ⁺)
4з; 4б	<i>cagA</i> ⁻ <i>vacA</i> ⁺ (<i>s1</i> ⁺ <i>m1</i> ⁻ <i>s2</i> ⁻ <i>m2</i> ⁺)	<i>cagA</i> ⁻ <i>vacA</i> ⁺ (<i>s1</i> ⁻ <i>m1</i> ⁺ <i>s2</i> ⁻ <i>m2</i> ⁺)
5з; 5б	<i>cagA</i> ⁻ <i>vacA</i> ⁺ (<i>s1</i> ⁺ <i>m1</i> ⁻ <i>s2</i> ⁻ <i>m2</i> ⁺)	<i>cagA</i> ⁺ <i>vacA</i> ⁺ (<i>s1</i> ⁻ <i>m1</i> ⁻ <i>s2</i> ⁻ <i>m2</i> ⁺)
6з	<i>cagA</i> ⁻ <i>vacA</i> ⁺ (<i>s1</i> ⁻ <i>m1</i> ⁺ <i>s2</i> ⁻ <i>m2</i> ⁻)	Н
8б	Н	<i>cagA</i> ⁻ <i>vacA</i> ⁺ (<i>s1</i> ⁻ <i>m1</i> ⁺ <i>s2</i> ⁻ <i>m2</i> ⁺)
10б	Н	<i>cagA</i> ⁻ <i>vacA</i> ⁺ (<i>s1</i> ⁻ <i>m1</i> ⁺ <i>s2</i> ⁻ <i>m2</i> ⁺)

Продолжение таблицы 15

№ пробы	Генотип чистой культуры <i>H. pylori</i> , выделенной из	
	материала зубодесневых карманов	биоптатов
11з; 11б	<i>cagA⁺vacA⁺(s1⁺m1⁺s2⁻m2⁺)</i>	<i>cagA⁺vacA⁺(s⁻m1⁺s2⁻m2⁻)</i>
Примечание – «Н» – микроорганизм не выделен и исследование не проводилось		

Тяжесть хронических заболеваний (атрофического гастрита, язвенной болезни желудка, рака) зависит от степени патогенности штаммов бактерии, наличия генов, определяющих синтез факторов вирулентности и входящих в так называемый «остров патогенности» *H. pylori*: *cagA*, *vacA* (подтипы – s1, s2; аллели – m1, m2), *iceA* (аллели A1 и A2), *babA* [108]. Высокопатогенные штаммы *H. pylori* относят к первому типу, имеющему генотипы *cagA⁺vacA⁺*, *cagA⁺vacA⁻* или *cagA⁻vacA⁺*. У низкопатогенных штаммов гены *cagA* и *vacA* отсутствуют, гены *iceA* и *babA* представлены незначительно либо отсутствуют [109].

Из семи определенных генотипов культур *H. pylori* наиболее высокой патогенностью, как следует из таблицы 15, обладают штаммы, выделенные из проб №1з, №5б, №11б; средней патогенностью штаммы – из проб №3з, №4з, №4б, №5з, №8б, №10б, низкой патогенностью – из пробы №3б.

Гены *iceA* и *babA* ни у одного из штаммов обнаружены не были.

Для дальнейшей работы по созданию экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы для детекции белка патогенности CagA *H. pylori* был выбран *cagA⁺* штамм – 11б с генотипом *cagA⁺vacA⁺(s1⁺m1⁺s2⁻m2⁻)*.

3.2.3 Идентификация штаммов *Helicobacter pylori* с использованием иммунохроматографического анализа

Тестирование выделенных и идентифицированных штаммов *H. pylori* провели также с использованием существующих на российском рынке иммунохроматографических тест-систем для диагностики хеликобактериоза «РЭД *Helicobacter pylori*» и «NovaMed». Для тестирования использовали смыв культуры *H. pylori* в концентрациях $1,0 \cdot 10^{10}$ м.к.·см⁻³ и $1 \cdot 10^9$ м.к.·см⁻³, приготовленные на буфере разгона (0,01 М Трис-буфере с 0,1 % Tween 20, pH 7,5).

На рисунке 8 показан результат тестирования штамма *H. pylori* 116 с использованием иммунохроматографических тест-систем «РЭД *Helicobacter pylori*» (А) и «NovaMed» (Б). По данным исследования культуры *H. pylori* в концентрации $1,0 \cdot 10^{10}$ м.к.·см⁻³ был выявлен положительный результат на обеих тест-системах, результат тестирования культуры в концентрации $1 \cdot 10^9$ м.к.·см⁻³ оказался отрицательным.

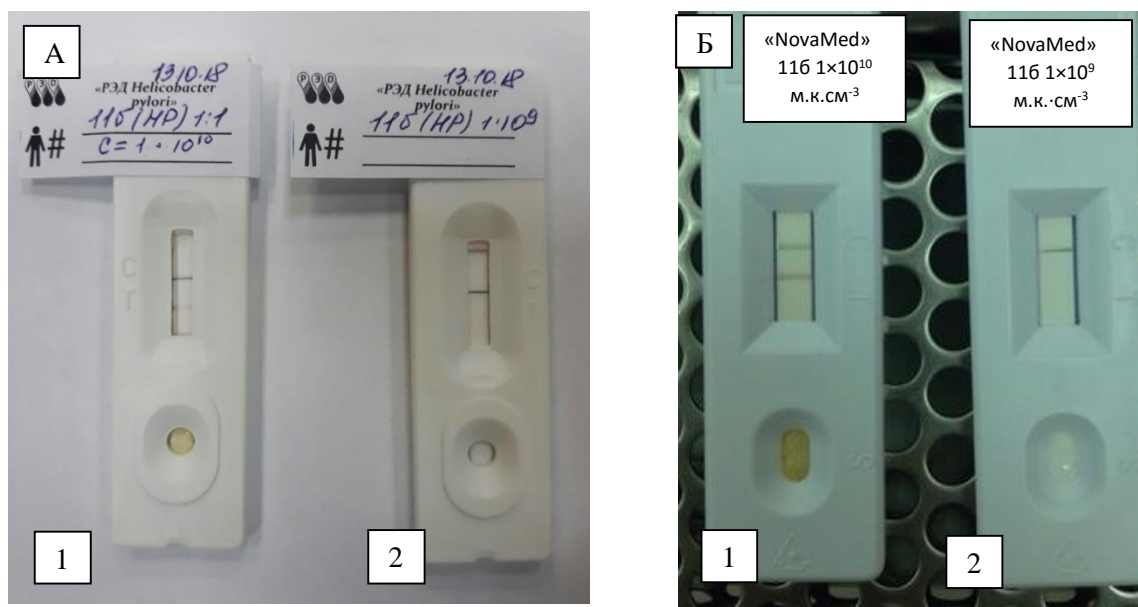


Рисунок 8 – Результат тестирования суспензии штамма *H. pylori* 116 с использованием иммунохроматографических тест-систем «РЭД *Helicobacter pylori*» (А) и «NovaMed» (Б)

Концентрация клеток: 1 – $1 \cdot 10^{10}$ м.к.·см⁻³, 2 – $1 \cdot 10^9$ м.к.·см⁻³

Результат тестирования выделенной нами культуры с использованием коммерческих иммунохроматографических тест-систем еще раз подтвердил ее принадлежность к виду *H. pylori*. Кроме этого, данный этап исследования показал, что чувствительность данных тест-систем невысока и их в большей степени можно отнести к качественным нежели количественным. Это объяснимо с точки зрения информации, представленной нами в аналитическом обзоре о зависимости чувствительности иммунохроматографических тест-систем от расположения тестируемых антигенов в клетке микроорганизма.

ГЛАВА 4. РАЗРАБОТКА ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОГО ОБРАЗЦА ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ВЫЯВЛЕНИЯ БЕЛКА CagA *Helicobacter pylori*

4.1 Получение наночастиц коллоидного золота

Используемый в иммунохроматографии маркер во многом определяет качество создаваемой тест-системы. Коллоидное золото, применяемое в качестве маркера в иммунохроматографии, должно быть однородным по форме, размеру и обладать стабильностью. Наночастицы не должны образовывать конгломератов и выпадать в осадок при хранении. Из данных литературы следует, что оптимальный размер коллоидного золота для ИХА составляет 25-30 нм [78].

В основе синтеза НчКЗ лежит цитратный метод Френса. Однако большое число модификаций данного метода, отсутствие четких рекомендаций по приготовлению коллоидного золота, обосновали целесообразность отработки пошаговой методики получения НчКЗ размером 25-30 нм, оптимальным для эффективной сорбции антител [78].

В ходе работы определили влияние на качество получаемых препаратов НчКЗ следующих условий:

- 1) температуры воды, при которой необходимо вносить золотохлористоводородную кислоту (ЗХВК) (в холодную, подогретую или кипящую воду);
- 2) времени появления первых признаков закипания (3 или 6 мин), когда следует вносить необходимые реагенты (ЗХВК и/или цитрат натрия);
- 3) числа оборотов мешалки в начале эксперимента (375 или 800 об·мин⁻¹) и при появлении красной окраски раствора (500 или 800 об·мин⁻¹).

Условия получения препаратов наночастиц коллоидного золота представлены в таблице 16.

Таблица 16 – Условия получения препаратов НчКЗ

Условия проведения эксперимента	№ серии НчКЗ					
	1	2	3	4	5	6
Объем воды, мл	49,23					
Объем 10,0 % ЗХВК, мл	0,058					
Объем 1,0 % цитрата натрия, мл	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72	0,72
Условия внесения ЗХВК	ЗХВК вносили в холодную воду, кипятили 2 мин, добавляли цитрат натрия		Через 3 мин от постановки колбы на плитку (начало закипания раствора)		Через 6 мин от постановки колбы на плитку (кипение раствора, стекание конденсата по стенкам)	
Условия внесения цитрата натрия	Через 2 мин после внесения ЗХВК					
Число оборотов мешалки в начале эксперимента, об·мин ⁻¹	800	375	800	375	800	375
Число оборотов мешалки с момента появления красной окраски до окончания эксперимента, об·мин ⁻¹	800	500	800	500	800	500
Температура, установленная на магнитной мешалке, в начале эксперимента, °С	300	300	300	300	300	300
Температура, установленная на магнитной мешалке, с момента появления красной окраски до окончания эксперимента, °С	200	200	200	200	200	200

Полученные препараты наночастиц коллоидного золота оценивали визуально, методом спектрофотометрии и электронной микроскопии, результаты исследования представлены в таблице 17.

Таблица 17 – Результаты оценки полученных серий препаратов наночастиц коллоидного золота

Показатель	Значения показателя для серии препарата коллоидного золота					
	1	2	3	4	5	6
Цвет коллоидного раствора	Раствор имеет синий оттенок, без осадка	Раствор имеет синий оттенок, без осадка	Раствор красного цвета, без осадка	Раствор рубиново-красного цвета, без осадка	Раствор имеет светло-красный цвет, без осадка	Раствор имеет насыщенную рубиново-красную окраску
Форма частиц (по данным электронной микроскопии)	Разной формы: сферической, овальной, круглой, встречаются треугольной	Частицы многоугольной формы	Овальная, круглая, единичные треугольные	Овальная, круглая	Сферическая, имеются единичные многоугольные частицы	Овальная, круглая
Однородность по форме и размеру	Неоднородные	Неоднородные	Однородные	Однородные	Однородные	Однородные
Наличие конгломератов	Есть	Есть	Нет	Нет	Нет	Нет
Средний диаметр частиц, нм (по данным электронной микроскопии)	35,0	40,0	21,5	26,7	20,0	30,0
Оптическая плотность раствора (ОР): – максимум пика поглощения (ед. ОР); – длина волны максимума пика поглощения, нм; – диаметр частиц коллоидного золота (d_{cp}), определенный по результатам спектрофотометрии и электронной микроскопии, нм	0,055 530 40	0,075 533 40-50	0,785 525 20-30	1,020 526 30	0,690 523 15-20	0,867 525 20-30

Данные, представленные в таблице 17, свидетельствуют о том, что препараты коллоидного золота № 1 и № 2 некондиционны, о чем свидетельствует синий цвет раствора и результаты электронной микроскопии – частицы разные по форме и размеру, образуют скопления в виде конгломератов, поэтому не могут быть использованы для дальнейшей работы.

Препараты серий №№ 3-6 получились более кондиционными. По данным электронной микроскопии НЧКЗ в указанных сериях однородны по форме и размерам. По результатам спектрофотометрии получены равнобедренные пики поглощения, подтверждающие хороший дисперсионный состав наночастиц, оптическая плотность данных серий получилась близкой к 1, что также является признаком кондиционности [82]. Серии № 4 и № 6 отличаются большей однородностью частиц по форме и размерам, что позволяет сделать вывод о том, что режим перемешивания оказывает влияние на однородность частиц в препарате (плавный переход от 375 об·мин⁻¹ до 500 об·мин⁻¹ способствует получению гомогенных препаратов). Наиболее близкой по характеристикам к желаемым 30 нм стала серия наночастиц № 6.

По результатам эксперимента установили, что:

- 1) внесение ЗХВК в холодную воду приводит к появлению конгломератов; добавление ЗХВК в подогретую или кипящую воду принципиально не влияет на качество полученных НЧКЗ;
- 2) добавлении ЗХВК через 6 мин от начала подогрева реакционной смеси (постановки колбы на магнитную мешалку) до появления первых признаков закипания – начало стекания конденсата по стенкам колбы; приводит к лучшим результатам;
- 3) оптимальный режим работы мешалки оказался следующий: в начале эксперимента 375 об·мин⁻¹, после покраснения раствора – 500 об·мин⁻¹;
- 4) после появления красной окраски для стабилизации частиц следует перемешивать со скоростью 500 об·мин⁻¹ при 200 °С еще 20 мин.

Методику получения препаратов НЧКЗ со средним диаметром частиц 25-30 нм в объеме 50 мл можно представить следующим образом [110]:

- 1) деионизированную воду комнатной температуры в объеме 49,23 мл налить в колбу Эрлейнмейера и внести «перемешивающий» стержень;
- 2) поместить колбу на магнитную мешалку, надеть на колбу дефлегматор с закрытыми стерильной фольгой отверстиями установить режим работы мешалки 375 об·мин⁻¹ и температуру 300 °С;
- 3) спустя 6 мин внести 0,058 мл 10 % раствора ЗХВК, кипятить 2 мин, внести 0,72 мл 1,0 % раствора цитрата натрия;
- 4) при изменении окраски раствора с синего на красный увеличить число оборотов до 500 об·мин⁻¹ и понизить температуру до 200 °С;
- 5) кипятить раствор еще 20 мин, выключить нагрев, снять дефлегматор.

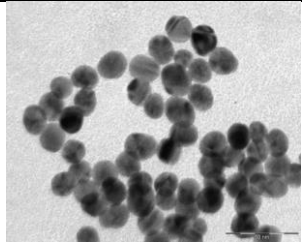
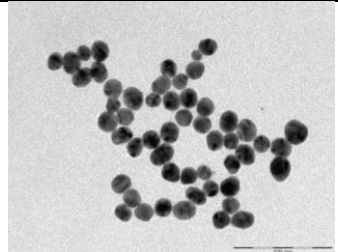
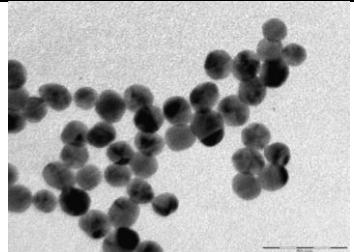
Раствор наночастиц выдержать при комнатной температуре в течение суток, затем хранить в холодильнике при 4 °С.

Для проверки воспроизводимости результатов по разработанной методике нами было получено 3 серии препаратов, характеристика которых представлена в таблице 18.

Таблица 18 – Результаты оценки серий препаратов НчКЗ, подтверждающие воспроизводимость способа получения наночастиц коллоидного золота со средним диаметром 25-30 нм

Показатель	Характеристика серии препарата коллоидного золота		
	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 склеены между собой, не образуют конгломератов, равномерно окрашены 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 18

Показатель	Характеристика серии препарата коллоидного золота		
	23/16	24/16	25/16
Наличие конгломератов	Нет	Нет	Нет
Средний диаметр частиц, нм (по данным электронной микроскопии)	30	25	26
Оптическая плотность раствора (ОР): – максимум пика поглощения (ед. ОР); – длина волны максимума пика поглощения, нм; – средний диаметр частиц коллоидного золота, определенный по результатам спектрофотометрии, нм	1,379 525-526 30	1,314 523-524 20	1,395 524-525 25
Фотография препарата НчКЗ			

Таким образом, нами была разработана пошаговая методика получения кондционных препаратов наночастиц коллоидного золота со средним диаметром наночастиц 30 нм, которая нашла свое отражение в патенте на изобретение [110].

4.2 Выбор оптимальной концентраций антител для сорбции на наночастицах коллоидного золота

Для получения конъюгата НчКЗ с МкАТ необходимо определить оптимальную концентрацию антител, необходимую для защиты наночастиц от солевой агрегации. С этой целью обычно используют методику Жигмонди – определение «золотого числа» [111].

Для определения «золотого числа» брали полученный препарат НчКЗ с диаметром 30 нм и мышинные МкАТ к белку *CagA H. pylori*, клоны НР-387 и НР-1811. Раствор НчКЗ доводили до значения рН 9,0, добавляя 0,1 М раствор карбоната калия. Сначала получали раствор МкАТ с концентрацией 200 мкг·см⁻³, разводя исходную концентрацию антител НР-1811 и НР-387 0,001 М Трис-буфером. После чего проводили титрование антител в планшете с шагом два, получая конечную концентрацию 1,5 мкг·см⁻³. К 100 мкл антител с определенной концентрацией, соответствующей каждой лунке, добавляли 100 мкл раствора НчКЗ, перемешивали и инкубировали 15 мин при комнатной температуре. Затем в каждую лунку вносили 11 мкл 10 % раствора хлорида натрия, перемешивали и через 10 мин измеряли оптическую плотность содержимого при длине волны 630 нм на спектрофотометре «СПЕКС СПП-705-4» (ЗАО «Спектроскопические системы», Россия).

Результат анализировали на спектрофотометре «SectraMax Plus 384» («Molecular devises», США) при длине волны $\lambda=630$ нм. По результатам спектрофотометрии строили кривую зависимости оптической плотности от концентрации антител. На графике определяли точку выхода на плато, которая свидетельствует о достижении концентрации антител, достаточной для защиты наночастиц от солевой агрегации. Результаты определения концентрации МкАТ НР-387 и НР-1811 по результатам постановки золотого числа представлены на рисунке 9.

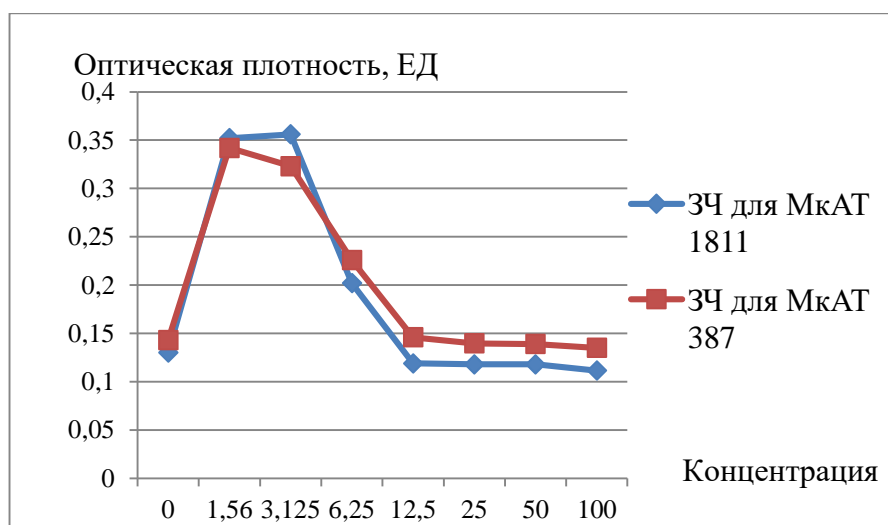


Рисунок 9 – Результаты определения ЗЧ для МкАТ НР-387 и НР-1811 с НчКЗ

Точка выхода на плато для МкАТ НР-387 соответствует $18 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$, для МкАТ НР-1811 – $16 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$. По данным литературы для получения конъюгата НчКЗ с МкАТ используют концентрацию антител на 10,0-20,0 % превышающую минимальную концентрацию, необходимую для предотвращения агрегации НчКЗ [86,87]. Поэтому итоговая концентрация антител, подходящая для получения конъюгата МкАТ с коллоидным золотом, составляет $18,4 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$ для МкАТ НР-387 и $20,7 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$ для МкАТ НР-1811.

4.3 Выбор оптимальной комбинации моноклональных антител в конъюгате и в тестовой зоне

Ключевым вопросом, который решался на следующем этапе работы, стал вопрос о том, какой из клонов антител пойдет на конъюгирование с коллоидным золотом, а какой сформирует аналитическую зону тест-системы.

Для приготовления конъюгата использовали два варианта МкАТ к белку СаgА (НР-387 и НР-1811) и серию НчКЗ со средним диаметром частиц 30 нм.

МкАТ разводили на 0,025 М сукцинатно-боратном буфере (СББ) с рН 9,0 до концентрации $40 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$. Раствор НчКЗ доводили до рН 9,0, добавляя 0,1 М раствор K_2CO_3 . Далее смешали в равных объемах МкАТ и раствор НчКЗ, получая итоговую концентрацию МкАТ $20 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$, инкубировали в течение 30 мин, каждые 10 мин перемешивая раствор на вортексе. Затем вносили профильтрованный 4,0 % раствор ПЭГ 40 000 до конечной концентрации 0,25 %. Через 15 мин конъюгат наслаивали на 0,025 М Трис-буфер с 10,0 % сахарозой и 0,02 % БСА, рН 8,5 и центрифугировали при ускорении $13400 \text{ об} \cdot \text{мин}^{-1}$ 30 мин при 4°C для отделения несвязавшихся антител. После удаления супернатанта осадок растворяли в стабилизирующем буферном растворе.

Для выбора захватывающих и детектирующих антител разработали четыре варианта тест-системы, характеристика которых указана в таблице 19. В первом и третьем варианте НчКЗ конъюгировали с МкАТ-1811, во втором и четвертом – с

МкАТ-387. Для формирования тестовой зоны в первом и втором вариантах использовали МкАТ-1811, в третьем и четвертом – МкАТ-387. Для формирования контрольной зоны во всех четырех случаях использовали антитела кролика против иммуноглобулинов мыши. В качестве буфера разгона использовали 0,01 М Трис-буфер с 1 М NaCl и 0,1 % Tween 20, pH 7,5.

Варианты разработанных тест-систем представлены в таблице 19.

Таблица 19 – Характеристика вариантов иммунохроматографических тест-систем

Вариант тест-системы	Характеристика						
	конъюгата				тестовой зоны		
	НчКЗ с размером частиц, нм	вид МкАТ	концентрация МкАТ, мкг·см ⁻³	буфер для разведения МкАТ	вид МкАТ	концентрация МкАТ, мкг·см ⁻³	буфер, в котором находятся МкАТ
1	30	1811	20	0,025 М СББ	1811	12	0,1 М ФСБ
2		387			1811		
3		1811			387	8	
4		387			387		
Примечания:							
1. СББ – сукцинатно-боратный буфер.							
2. ФСБ – фосфатный солевой буфер							

Результаты исследований показали, что оптимальной оказалась комбинация антител в варианте 2 (МкАТ НР-387 с НчКЗ в конъюгате и МкАТ НР-1811 в тестовой зоне), обеспечивающая более яркое окрашивание точки нанесения аналитических антител при тестировании с суспензией культуры *H. pylori*.

При проверке чувствительности и специфичности тест-систем под номерами 1, 3 и 4 была выявлена неспецифическая реакция при тестировании отрицательного контроля – буфера разгона.

4.4 Сравнительный анализ комбинаций буферных растворов, используемых на различных этапах создания тест-системы

С целью сравнительного анализа влияния состава буферных растворов, используемых на разных этапах создания тест-системы, готовили 4 вида конъюгатов с использованием выбранной в предыдущем разделе комбинации МкАТ.

Для разведения МкАТ-387, находящихся исходно в 0,025 М ФСБ, до концентрации, определенной при постановке «золотого числа» $20 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$, использовали в первом варианте 0,025 М ФСБ с pH 9,0, во втором варианте 0,025 М СББ с pH 9,0, в третьем и четвертом вариантах для разведения антител применяли 0,025 М Трис-буфер с pH 9,0, данный буфер был выбран в результате анализа литературных источников [60, 72, 74].

МкАТ НР-387, разведенные в соответствующем буфере до концентрации $40 \text{ мкг} \cdot \text{см}^{-3}$, смешивали с равным объемом НчКЗ, получая конечную концентрацию МкАТ, определенную при постановке «золотого числа». Методика приготовления конъюгатов вариантов №№ 1-4 не отличалась от методики, представленной в пункте 4.3. 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 [112].

В методику приготовления конъюгата в варианте № 4 были внесены следующие изменения:

- вместо 0,025 М Трис-буфер с 10,0 % сахарозой и 0,02 % БСА, pH 8,5 в качестве стабилизирующего буфера использовали 0,025 М Трис-буфер, с 1,0 % БСА, 1,0 % сахарозой, 0,1 % Tween 20, pH 8,5 [72].
- полученный конъюгат не наслаивали на стабилизирующий буфер, а смешивали с ним, а затем центрифугировали в тех же условиях.

Растворы конъюгатов наконечником дозатора методом пропитывания наносили на мембраны для конъюгата с плотностью 30 мкл на 1 см^2 и высушивали на воздухе при комнатной температуре в течение суток.

В таблице 20 представлены сочетания буферных растворов, используемые при разработке иммунохроматографических тест-систем.

Таблица 20 – Сочетания буферных растворов, используемых при разработке иммунохроматографических тест-систем [93]

Вариант ИХ тест-системы	Характеристика буферных растворов		
	буфера для разведения АТ	буфера для отмывки конъюгата от несвязавшихся АТ	буфера разгона
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

На основе полученных конъюгатов были созданы 4 вида иммунохроматографических тест-систем. Для формирования тестовой зоны использовали МкАТ НР- 1811, для формирования контрольной зоны – антивидовые антитела кролика к иммуноглобулинам мыши.

При тестировании варианта № 1 с буфером разгона, не содержащим *H. pylori* (отрицательный контроль), наблюдали неспецифическую реакцию.

Применение в качестве буфера для разведения антител 0,025 М Трис-буфера является более оптимальным, поскольку интенсивность окраски тестовой зоны тест-систем, сделанных на основе конъюгатов № 3 и 4 была выше, чем в варианте № 2.

Сравнение конъюгатов № 3 и 4 показало, что наиболее оптимальным является вариант № 4, при использовании которого в составе тест-системы наблюдалось отсутствие неспецифического связывания с компонентами буфера разгона, более плавное перемещение конъюгата по рабочей мембране тест-системы и, как результат, наибольшая интенсивность окраски тестовой и контрольной зон. Улучшение результата связано с уменьшением концентрации сахарозы в составе конъюгата, увеличением концентрации БСА и добавлением Tween 20.

4.5 Определение оптимальной концентрации моноклональных антител в тестовой зоне

Одним из актуальных вопросов при разработке иммунохроматографической тест-системы является определение концентрации МкАТ, формирующих тестовую зону [93].

В эксперименте, направленном на определение оптимальной концентрации антител, мы развели МкАТ НР-1811 с шагом два в 0,025 М Трис-буфер с рН 9,0, получая концентрацию антител от $12,0 \text{ мг}\cdot\text{см}^{-3}$ до $1,5 \text{ мг}\cdot\text{см}^{-3}$, и нанесли на тестовую зону.

Для исследования созданных тест-систем на мембрану для образца внесли 100 мкл суспензии культуры *H. pylori* 11б в концентрации $1\cdot 10^{10} \text{ м.к.}\cdot\text{см}^{-3}$. Для контроля специфичности использовали в качестве образца буфер разгона (0,01 М Трис-буфер с 1 М NaCl и 0,1 % Tween 20, рН 7,5).

Результаты эксперимента показали, что уменьшение концентрации МкАТ-387 в тестовой зоне с $12 \text{ мг}\cdot\text{см}^{-3}$ до $6 \text{ мг}\cdot\text{см}^{-3}$, не сказывается на интенсивности окрашивания тестовой зоны, тогда как концентрация ниже данных значений не обеспечивает достаточную яркость окраски и затрудняет интерпретацию результатов (рисунок 10).

Концентрация МкАТ 1811 в аналитической зоне ..., $\text{мг}\cdot\text{см}^{-3}$					
контроль	12	6	3	1,5	0,75
-	++	++	+	+	+
					
Примечания: 1. «++», «+» – степень интенсивности окраски аналитической зоны 2. «-» – отсутствие окраски аналитической зоны					

Рисунок 10 – Оценка влияния концентраций МкАТ НР-1811 в тестовой зоне на интенсивность окраски тестовой зоны тест-системы

4.6 Определение зависимости качества иммунохроматографической тест-системы от вариантов использования мембран в мультимембранном композите

Иммунохроматографический анализ заключается в латеральной диффузии тестируемого материала и иммунокомпонентов по нитроцеллюлозной мембране. В связи с этим физические свойства компонентов мультимембранного композита во многом определяют качество иммунохроматографического анализа. Это влияет на интенсивность окраски зон специфического связывания и качество полученных результатов.

Анализ научно-технической информации показал, что ведущими фирмами по производству мембран для иммунохроматографии являются фирмы «Millipore» (США) и «MDI» («Advanced Microdevices», Индия) [59, 60, 62-64, 72-78].

Нитроцеллюлозная мембрана является ключевым компонентом иммунохроматографической тест-системы, потому что на её поверхности происходит формирование детектируемых иммунных комплексов. К основным характеристикам мембран относятся скорость латерального потока и диаметр пор. Среди мембран фирмы «MDI» для конструирования тест-систем выбирают обычно мембраны «CNPF10» с размером пор 10 мкм и скоростью латерального потока 4 см за 125 ± 5 с [72] (120 ± 5 с [88]) или «CNPC15» с размером пор 15 мкм и скоростью латерального потока 4 см за 100 ± 5 с. Среди мембран фирмы «Millipore» – «HF240» (скорость латерального течения – 4 см за 240 ± 5 с) [60, 88] или «HF120» (скорость латерального течения – 4 см за 120 ± 25 с).

На первом этапе провели сравнение рабочих мембран двух фирм производителей: «HF-135» («Millipore») и «CNPF 10μ» («MDI»), обладающими примерно равными скоростями латерального потока, 4 см за 135 ± 5 с и 4 см за 125 ± 5 с, соответственно. Результаты сравнительного анализа показали, что нитроцеллюлозная мембрана фирмы «MDI» обеспечивает более равномерное передвижение жидкости мембране и более интенсивную окраску тестовой и контрольной зоны. Кроме того, при проведении иммунохроматографического анализа при использовании мембраны фирмы «Millipore» наблюдалось фоновое окрашивание по ходу движения

фронта жидкости вне зон специфического связывания конъюгата, что искажало результаты анализа.

На втором этапе проведено сравнение конъюгатных мембран: «G041 Glass Fiber Conjugate Pad Strips» («Millipore», США) и «PT-R5» («MDI»). Результаты исследования также показали, что более качественный результат анализа обеспечивают мембраны фирмы «MDI» с указанными выше характеристиками, данные экспериментов подтвердили литературные данные, в которых наиболее часто используется мембрана для конъюгата «PT-R5» фирмы «MDI» [53, 62, 75].

В ходе исследования было установлено, что для разработки иммунохроматографической тест-системы для выявления белка CagA *H. pylori* в большей степени подходят мембраны производства фирмы «MDI», наименование и характеристика которых представлены в таблице 21.

Таблица 21 – Характеристика элементов мультимембранного композита иммунохроматографической тест-системы

Вид мембраны	Тип мембраны	Характеристики материалов
Аналитическая мембрана	«TYPE-CNPF-SN12-L2-P25», 10μ	Размер пор 10 мкм Толщина подложки 102±5 мкм Толщина мембраны 100±15 мкм Скорость потока образца 4 см/125±25 с
Мембрана для конъюгата	«PT-R5»	Скорость потока образца 4 см/26±8 с
Мембрана для образца	«TYPE-GFB-R4(0.35)»	Толщина 0,35 мм Скорость потока образца 4см/55±20 с
Мембраны для абсорбента	«TYPE-AP 045»	Толщина – 0,40 мм

4.7 Характеристика созданного экспериментального образца тест-системы для выявления белка CagA *Helicobacter pylori*

По результатам работы создан экспериментальный образец иммунохроматографической тест-системы для детекции белка CagA *H. pylori*, состав мультимембранного композита и основные компоненты которого представлены на рисунке 11 [113].

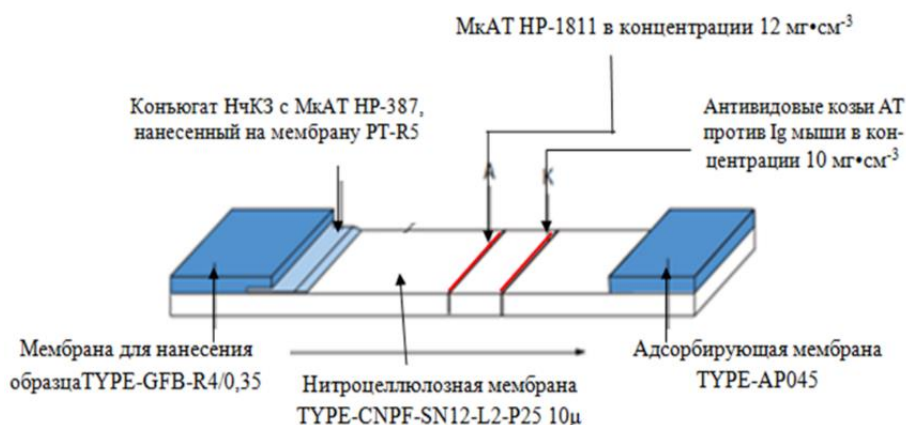


Рисунок 11 – Внешний вид и основные компоненты разработанного экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы для диагностики хеликобактериоза

Поэтапно методику изготовления разработанного экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы для выявления антигена *СagA H. pylori* можно представить следующим образом [110]:

1. Получение кондиционного препарата НчКЗ с диаметром частиц 25-30 нм

К 49,23 см³ деионизированной воды добавляли 0,058 см³ 10,0 % раствора золотохлористоводородной кислоты $\text{HAuCl}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 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 [110].

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 [112].

3. Получение 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 [112].

4. Формирование 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 анти-видовых антитела козы против иммуноглобулинов мыши («Биалекса», Россия) в концентрации 10 мг·см⁻³. Готовые тест-системы высушивали при комнатной температуре в течение суток [112].

ГЛАВА 5. ОЦЕНКА ВОЗМОЖНОСТИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОЙ ТЕСТ-СИСТЕМЫ ДЛЯ ДЕТЕКЦИИ ВЫСОКОПАТОГЕННЫХ ШТАММОВ *H. pylori*

Экспериментальный образец иммунохроматографической тест-системы для выявления белка *CagA H. pylori* оценивали по критериям чувствительности и специфичности, а также по сопоставимости результатов выявления высокопатогенных *CagA*⁺ штаммов *H. pylori* с использованием разработанного экспериментального образца тест-системы с одним из самых точных и высокочувствительных методов – молекулярно-генетическим.

5.1 Оценка специфичности и чувствительности экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы

На первом этапе провели оценку специфичности и чувствительности изготовленного экспериментального образца тест-системы.

Для оценки специфичности использовали культуру *P. vulgaris* из коллекции культур кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Вятского государственного университета». Данный микроорганизм также является этиологическим агентом заболеваний желудочно-кишечного тракта, а также присутствует в кишечнике здорового человека и многих животных.

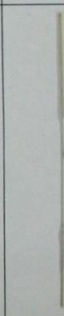
Для оценки чувствительности использовали культуру *H. pylori* 11б также из коллекции кафедры микробиологии ФГБОУ ВО «Вятского государственного университета», поскольку в ее геноме присутствует ген *cagA*, ответственный за синтез белка *CagA*.

В качестве отрицательного контроля использовали 0,01 М Трис-буфер с 1 М NaCl и 0,1 % Tween 20, pH 7,5.

Для тестирования *H. pylori* брали в концентрации $1 \cdot 10^{10}$, $5 \cdot 10^9$, $2,5 \cdot 10^9$ и $1,25 \cdot 10^9$ м.к.·см⁻³ и *P. vulgaris* – в концентрации $1,5 \cdot 10^{10}$ и $1,0 \cdot 10^9$ м.к.·см⁻³. Культуры разводили до необходимых концентраций буфером разгона.

Анализ иммунохроматографических тест-систем проводили при комнатной температуре. На мембрану для образца наносили 100 мкл исследуемой пробы. Результаты определяли визуально через 20-25 мин.

Результаты проверки чувствительности и специфичности тест-системы представлены на рисунке 12.

Проверка чувствительности и специфичности иммунохроматографической тест-системы						
Контроль	Культура <i>Helicobacter pylori</i> в концентрации..., м.к.·см ⁻³				Культура <i>Proteus vulgaris</i> в концентрации..., м.к.·см ⁻³	
	1×10^{10}	5×10^9	$2,5 \times 10^9$	$1,25 \times 10^9$	1×10^{10}	$1,25 \times 10^9$
-	++	++	+	-	-	-
						

Примечания:
 1. «++», «+» – степень интенсивности окраски аналитической зоны
 2. «-» – отсутствие окраски аналитической зоны

Рисунок 12 – Проверка чувствительности и специфичности экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы

По результатам тестирования выявлено, что экспериментальный образец иммунохроматографической тест-системы обладает порогом чувствительности – $2,5 \cdot 10^9$ м.к.·см⁻³. Появление окрашивания в тестовой зоне свидетельствует о том, что в исследуемой пробе содержится белок CagA. Появление окрашивания в контрольной зоне указывает на корректность проведенного анализа. Низкий порог чувствительности тест-системы, направленной на детекцию CagA белка *H. pylori*, вполне объясним научными данными, изложенными в п. 1.4, о зависимости чувствительности иммунохроматографических тест-систем от расположения антигена в микроорганизме, на выявление которого они направлены [114].

Доказана специфичность разработанного образца иммунохроматографической тест-системы. При тестировании гетерогенной культуры *P. vulgaris* окрашивания тестовой зоны не наблюдали в обоих вариантах используемых концентраций, что свидетельствует об отсутствии неспецифической реакции. Кроме этого, окрашивания тестовой зоны не наблюдали и при тестировании буфера разгона, а также штаммов *H. pylori* 3б, 4б, 5б, в геноме которых молекулярно-генетическим методом не было выявлено гена *cagA*.

Таким образом, по результатам исследования определен порог чувствительности созданного экспериментального образца тест-системы – $2,5 \cdot 10^9$ м.к.·см⁻³.

5.2. Оценка возможности использования лактата серебра для повышения чувствительности иммунохроматографической тест-системы

С целью повышения чувствительности созданного экспериментального образца рассмотрели возможность применения лактата серебра. По данным литературы, взаимодействие солей серебра с коллоидным золотом вызывает усиление окрашивания, вызванное восстановлением катиона и образованием оболочки металлического серебра вокруг наночастиц [82].

Так, например, в работе Бызовой Н.А. и соавт. [72] была использована иммунохроматография с усилением окрашивания лактатом серебра тестовой и контрольной зон. На первом этапе работы мы повторили методику, указанную в статье.

Для этого применяли два листа мембраны для конъюгата «РТ-R5» («MDI», Индия). Каждый из них трижды промывали дистиллированной водой и высушивали. Первую пропитывали 0,3 % раствором лактата серебра, растворенного в деионизированной воде, вторую – 3,0 % раствором гидрохинона, приготовленном на 0,5 М цитратном буфере с рН 4,0. Высушивали мембраны в темноте и при комнатной температуре в течение суток.

Затем на нитроцеллюлозную мембрану классической тест-системы после проведения иммунохроматографического анализа (закапывания раствора, содержащего антиген и появления окрашенных тестовой и контрольной зон) на область

расположения тестовой и контрольной зон накладывали последовательно две мембраны – сначала с лактатом серебра, поверх нее – с гидрохиноном, затем капали 100 мкл дистиллированной воды. Через 10 мин мембраны снимали и регистрировали результат.

По результатам усиления тест-системы лактатом серебра по методике, представленной в статье, повышения чувствительности добиться не удалось. Поэтому нами было принято решение обрабатывать лактатом серебра непосредственно рабочую мембрану и мембрану для конъюгата, входящие в состав тест-системы. Варианты полученных тест-систем представлены в таблице 22.

Таблица 22 – Варианты иммунохроматографических тест-систем с компонентами, усиленными лактатом серебра

№ варианта	Обработка 0,3 % раствором лактата серебра	
	мембрана для конъюгата	рабочая мембрана
1	-	-
2	-	+
3	+	-
4	+	+

Примечания:
 1. «-» – мембрана не обрабатывалась 0,3 % раствором лактата серебра.
 2. «+» – мембрана обрабатывалась 0,3 % раствором лактата серебра

Таким образом, первый вариант тест-системы представлял собой классическую версию иммунохроматографической тест-системы, без усиления лактатом серебра. Во втором и третьем варианте модификации подвергался один из компонентов (мембрана для нанесения конъюгата или нитроцеллюлозная рабочая мембрана, соответственно). Четвертый вариант характеризовался модификацией обоих компонентов тест-системы.

Мембраны, пропитанные лактатом серебра, оставляли сушиться на сутки в темном месте при комнатной температуре. Затем проводили нанесение конъюгата, склеивание мембранных компонентов, нарезку тест-систем и нанесение тестовой и контрольной зон. Заранее готовили мембрану «PT-R5», пропитанную 3,0 % раствором гидрохинона, приготовленным на 0,5 М цитратном буфере с pH 4,0. Высушивали мембрану при комнатной температуре в течение суток.

Проверку работоспособности полученных вариантов тест-систем проводили при тестировании буфера разгона (0,01 М Трис-буфер с 1 М NaCl с 0,1 % Tween 20, pH 7,5) и культуры *H. pylori* 11б в концентрации $1 \cdot 10^{10}$ м.к.·см⁻³ (таблица 23).

После внесения пробы, содержащей *H. pylori*, появления точек в тестовой и контрольной зонах, на них накладывали мембрану «PT-R5», предварительно пропитанную 3,0 % гидрохиноном. На наложенную мембрану для проявления реакции наносили 30 мкл буфера разгона.

Таблица 23 – Результат тестирования классической и усовершенствованных вариантов тест-систем

Вариант тест-системы	Материал для тестирования...			
	буфер разгона		<i>H. pylori</i> $1 \cdot 10^{10}$ м.к.·см ⁻³	
	Мембрану с гидрохиноном при тестировании не использовали	Мембрану с гидрохиноном при тестировании использовали	Мембрану с гидрохиноном при тестировании не использовали	Мембрану с гидрохиноном при тестировании использовали
1	-	-	+	+
2	-	-	++	+++
3	±	±	+	+
4	±	±	+	++

Примечания:
 1. «-» – отсутствие реакции;
 2. «±» – слабopоложительная реакция;
 3. «+, ++, +++» – положительная реакция, количество плюсов указывает на интенсивность окраски

Результаты тестирования показали, что обработка солью серебра рабочей мембраны приводит к усилению окрашивания как тестовой, так и контрольной зоны (варианты тест-систем № 2 и № 4) по сравнению с немодифицированной тест-системой № 1. Обработка лактатом серебра только мембраны для конъюгата (вариант № 3) не приводит к усилению окрашивания зон. При этом стоит отметить, что обработка мембраны для конъюгата лактатом серебра (вариант № 3 и № 4) приводит к почернению конъюгата и затруднению его движения по рабочей мембране.








Поэтому наиболее перспективным является усиление лактатом серебра только рабочей мембраны (вариант № 2), наложение мембраны с гидрохиноном на заключительном этапе анализа приводит к усилению окраски как тестовой, так и контрольной зоны иммунохроматографической тест-системы.

Однако при нанесении 0,3 % раствора лактата серебра на рабочую мембрану наблюдается окрашивание мембраны в желтый цвет, что мешает интерпретации анализа. Для решения этой проблемы решили уменьшить концентрацию лактата серебра до 0,075 % и провести повторный эксперимент, который показал такой же эффект по усилению сигнала в тестовой зоне, но снижение концентрации лактата серебра с 0,3 % до 0,075 % положительно повлияло на уменьшение фоновой окраски рабочей мембраны.







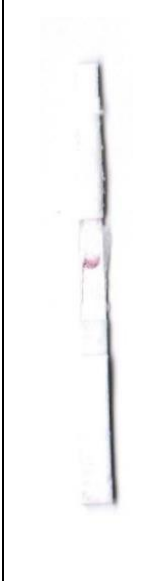
В итоге для оценки чувствительности был выбран вариант тест-системы № 2, в котором обработке 0,075 % лактатом серебра подвергалась только рабочая нитроцеллюлозная мембрана.

Для оценки чувствительности классического и усиленного вариантов иммунохроматографической тест-системы (варианта № 2) использовали культуры *H. pylori* в концентрации от $1 \cdot 10^{10}$ м.к.·см⁻³ до $31,2 \cdot 10^8$ м.к.·см⁻³. В качестве буфера разгона использовался 0,01 М Трис-буфер с 1 М NaCl и 0,1 % Tween 20, pH 7,5. Результат тестирования представлен в таблице 24.

Таблица 24 – 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	$10,00 \cdot 10^9$	$5,00 \cdot 10^9$	$2,50 \cdot 10^9$	$1,25 \cdot 10^9$	$0,62 \cdot 10^9$	$0,31 \cdot 10^9$
Не модифицированная тест-система							








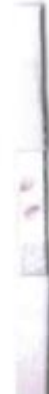


Продолжение таблицы 24

	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							

Порог чувствительности экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы без модификаций составил $2,5 \cdot 10^9$ м.к.·см⁻³, а при усилении лактатом серебра порог снизился до $6,25 \cdot 10^8$ м.к.·см⁻³.

На следующем этапе проверки чувствительности экспериментального образца провели тестирование с коммерческим антигеном «AGHPY-0100» в концентрации от $0,5$ мг·см⁻³ до $0,0625$ мг·см⁻³, антиген разводили на $0,01$ М Трис-буфере с $0,1$ % Tween 20, pH 7,5. Результаты тестирования представлены в таблице 25.

Таблица 25 – Оценка влияния лактата серебра на чувствительность экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы при тестировании с антигеном «AGHPY-0100»

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

Порог чувствительности экспериментального образца тест-системы при тестировании с антигеном составил 0,5 мг·см⁻³. Порог чувствительности экспериментального образца, усиленного лактатом серебра, составил 0,125 мг·см⁻³.

Методика усиления иммунохроматографической тест-системы лактатом серебра выглядит следующим образом:

1. Обработанную 0,075 % раствором лактатом серебра нитроцеллюлозную мембрану сушили в темноте при комнатной температуре в течение суток.
2. На мембрану «PT-R5» наносили 3,0 % раствор гидрохинона, приготовленный на 0,5 М цитратном буфере с pH 4,0, сушили при комнатной температуре в течение суток.

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

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

5. На наложенную мембрану с гидрохиноном наносили 30 мл буфера разгона, выдержали 5 мин и убрали мембрану. Результаты определяли визуально в течение 20-25 мин.

Таким образом, 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). Данный прием можно использовать для повышения чувствительности и других иммунохроматографических тест-систем, предназначенных для диагностики как инфекционных, так и неинфекционных агентов.

5.3 Скрининг пациентов на наличие хеликобактериоза для отбора в тестирование разработанного образца иммунохроматографической тест-системы

На следующем этапе протестировали разработанный образец иммунохроматографической тест-системы с различным биологическим материалом пациентов, в анамнезе которых были гастрит или язвенная болезнь желудка и которые не получали раньше антихеликобактерную терапию. В связи с этим обследовали добровольцев и отобрали только тех, биологический материал которых потенциально мог бы содержать белок CagA *H. pylori*.

Для отбора добровольцев проводили тестирование сывороток крови на наличие антител к белку CagA *H. pylori* с помощью коммерческого набора для ДОТ-анализа «Хелико-экспресс» («ВЕКТОР-БЕСТ», Россия) как описано в п.п. 2.7.6.

По результатам скрининга выбрано 50 серопозитивных лиц, у которых были выявлены антитела к белку CagA *H. pylori*. На рисунке 13 представлены результаты тестирования сывороток с помощью набора для ДОТ-анализа «Хелико-экспресс».

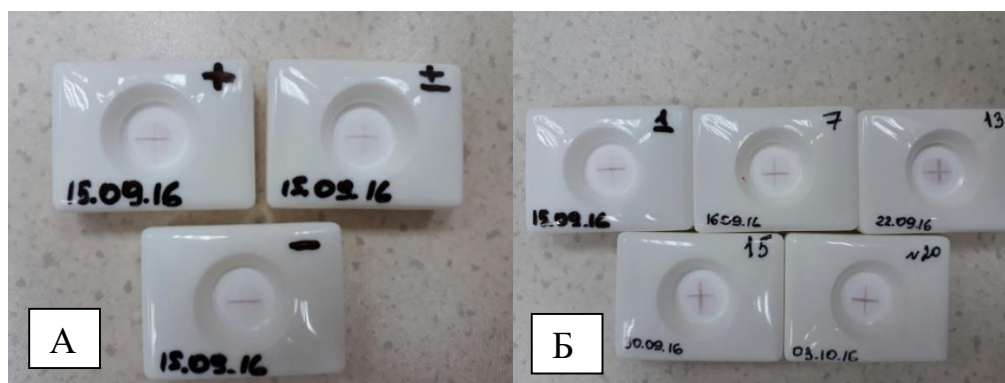


Рисунок 13 – Результаты тестирования сывороток: А – результат тестирования контрольных образцов (положительного, слабоположительного и отрицательного), заложенных в тест-систему «Хелико-экспресс»; Б – положительные результаты тестирования добровольцев

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 Хельсинской декларации Всемирной медицинской ассоциации (2000 г.).

Добровольцам было предложено пройти фиброгастроскопию для проведения биопсии слизистой желудка. Кроме этого, у данных пациентов на исследование

были взяты кал и материал из зубодесневых карманов. Забор и пробоподготовка материала проводилась в соответствии с п.п. 2.7.3.

На первом этапе провели бактериологическое исследование биологического материала пациентов (культур, выделенных из биопсийного материала слизистой желудка, кала, материала зубодесневых карманов) с целью индикации в нем *H. pylori* в соответствии с данными, изложенными в п.п. 2.7.4.

Из 50 серопозитивных добровольцев отобрали 40 человек, у которых выделение чистой культуры *H. pylori* было проведено из всех видов биологического материала. Таким образом, в исследовании приняло участие 23 женщины и 17 мужчин, средний возраст добровольцев составил 40 ± 5 лет.

Все выделенные культуры были протестированы на предмет наличия патогенного белка CagA молекулярно-генетическим методом в соответствии с данными, изложенными в п.п. 2.7.5.

Результаты бактериологического и молекулярно-генетического методов исследования различного биологического материала добровольцев представлены в Приложении В.

Таким образом, 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 90,0 % случаев, в кале – в 35,0 %, в материале из зубодесневых карманов – в 52,5 % случаев. Из них молекулярно-генетическим методом ген *cagA*, ответственный за синтез бактерией белка патогенности CagA, в выделенных штаммах *H. pylori* был выявлен, соответственно, в 25,0 %, в 26,7 % и в 34,8 % случаев. Именно биологический материал данных добровольцев, инфицированных высокопатогенными штаммами микроорганизма и нуждающихся в назначении антихеликобактерной терапии, был отобран нами для тестирования разработанного образца иммунохроматографической тест-системы.

5.4 Сравнительный анализ выделения чистой культуры *H. pylori* бактериологическим методом, выявления гена *cagA* молекулярно-генетическим методом и белка *CagA* иммунохроматографическим методом

Тестирование экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы, разработанной для детекции белка *CagA H. pylori*, проводили с биологическим материалом пациентов, отобранных на предыдущем этапе работы: с чистой культурой, выделенной из биопсийного материала слизистой желудка, кала и содержимого зубодесневых карманов.

Перед постановкой анализа проводили пробоподготовку биологического материала. Забор и пробоподготовку кала, биопсийного материала, содержимого зубодесневых карманов проводили в соответствии с п.п. 2.7.3, затем осуществляли высеивание материала на селективную питательную среду – колумбийский агар с эритроцитами и антибиотиками.

Культуры, выделенные из трех видов биологического материала, тестировали бактериологическим методом на предмет принадлежности к виду *H. pylori*, молекулярно-генетическим методом на наличие гена *cagA* и иммунохроматографическим методом с использованием разработанного экспериментального образца тест-системы на наличие в пробах белка *CagA H. pylori*. Результаты исследования представлены в Приложении Г.

На рисунке 14 представлен сравнительный анализ выявления чистой культуры *H. pylori* бактериологическим методом, гена *cagA* молекулярно-генетическим и белка *CagA* иммунохроматографическим методами в зависимости от вида исследуемого материала.

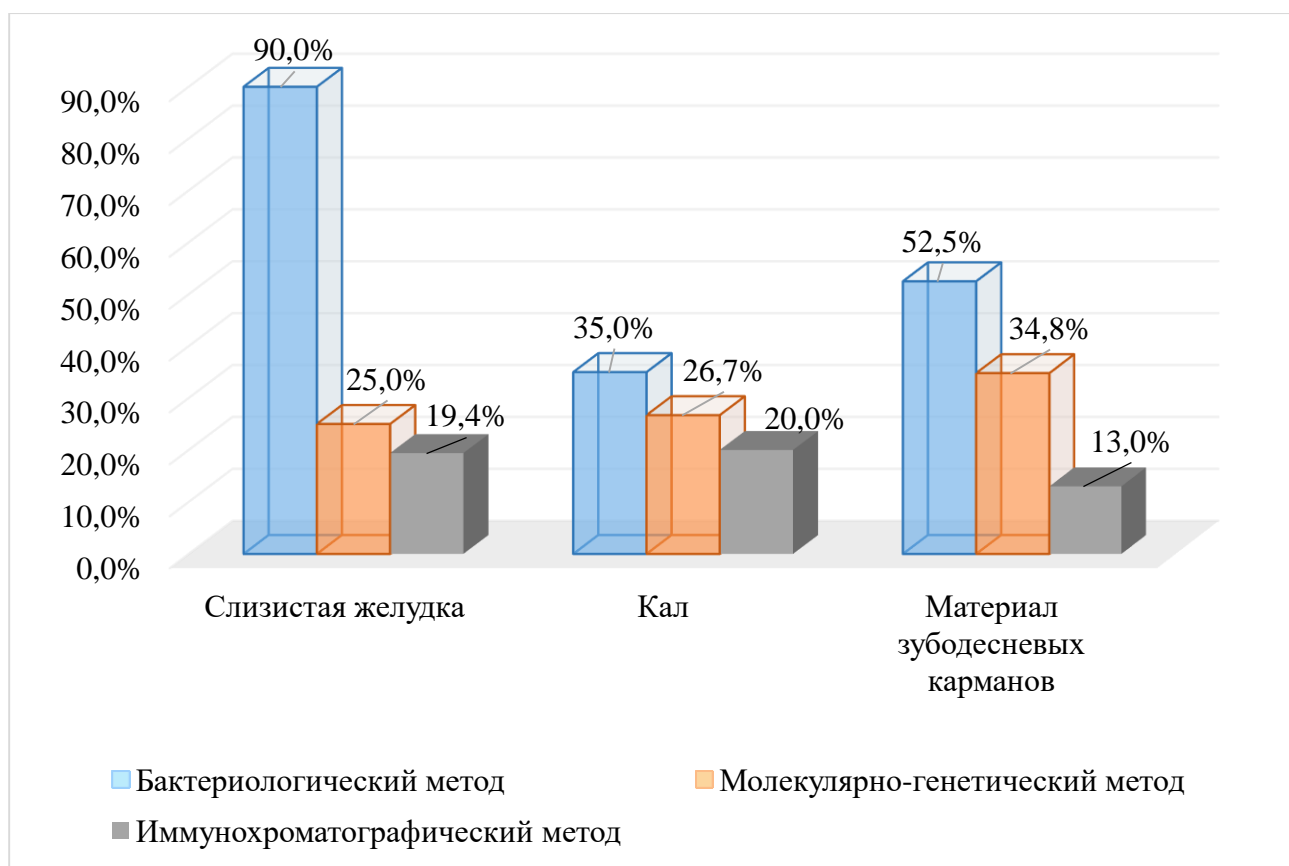


Рисунок 14 – Сравнительный анализ выявления чистой культуры *H. pylori* бактериологическим методом, гена *sagA* молекулярно-генетическим и белка *CagA* иммунохроматографическим методами в зависимости от вида исследуемого материала

По результатам оценки работоспособности разработанного экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы установили, что белок *CagA H. pylori* был выявлен в биологическом материале отобранных добровольцев, при тестировании биопсийного материала в 19,4 % случаев, при тестировании кала – в 20,0 % случаев, при тестировании материала зубодесневых карманов – в 13,0 %.

В таблице 26 представлена частоты положительных результатов взаимодействия между молекулярно-генетическим и иммунохроматографическим методами по выявлению *CagA*⁺ штаммов в материале, выделенном из слизистой оболочки желудка.

Таблица 26 – Положительные результаты молекулярно-генетического и иммунохроматографического анализа на CagA^+ штаммы

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 исследованной выборке 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 с помощью обоих методов (таблица 27).

Таблица 27 – Сравнение 95 % доверительных интервалов частот положительных результатов анализа на выявление CagA^+ штаммов

Сравнение 95 % доверительных интервалов частот положительных результатов анализа на выявление CagA^+ штаммов при использовании		p*
молекулярно-генетического анализа	иммунохроматографического анализа	
P, % (CI95%)	P, % (CI95%)	>0,05
13,88 – 41,23	9,91 – 35,09	

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 $p < 0,05$

Наблюдается перекрытие 95 % доверительных интервалов частот случаев выявления CagA^+ штаммов молекулярно-генетическим и иммунохроматографическим методами, что подтверждает отсутствие статистически значимого различия между результатами этих видов анализа.

Кроме этого, оценка работоспособности иммунохроматографического анализа нами была проведена при исследовании сопоставимости результатов выявления гена cagA и белка CagA молекулярно-генетическим и иммунохроматографическим методом, соответственно. В таблице 28 представлена количественная оценка плотности связи между результатами выявления CagA^+ штаммов методами молекулярно-генетического и иммунохроматографического анализа.

Таблица 28 – Оценка плотности связи между результатами выявления CagA^+ штаммов, полученными молекулярно-генетическим и иммунохроматографическим методами

Статистический критерий	Оценка плотности связи между результатами выявления CagA^+ штаммов при использовании	
	молекулярно-генетического анализа	иммунохроматографического анализа
τ -b Кендалла	0,85*	
d Сомера	0,93*	0,77*

Примечание – «*» – значение критерия 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, 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, а иммунохроматографический метод анализа может быть использован для выявления высокопатогенных штаммов *H. pylori*, секретирующих белок CagA .

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С момента открытия бактерий *H. pylori* и подтверждения их роли в патогенезе заболеваний ЖКТ прошло уже много лет. За это время было разработано много методов диагностики хеликобактериоза, каждый из которых имеет свои преимущества и недостатки.

В настоящее время все большую распространенность приобретают неинвазивные методы идентификации *H. pylori*, не требующие проведения фиброгастроскопии и биопсии слизистой оболочки желудка.

Среди неинвазивных методов диагностики инфекционных заболеваний ведущее место стали занимать иммунологические экспресс-тесты, к числу которых относятся иммунохроматографические тест-системы.

В настоящее время в России отсутствует иммунохроматографические тест-системы, предназначенные для выявления белка CagA *H. pylori*, определение которого так важно для выявления пациентов, инфицированных высокопатогенными штаммами микроорганизма, с целью рационального назначения им эрадикационной терапии.

Все вышесказанное обосновывает актуальность разработки экспериментального образца моноклональной иммунохроматографической тест-системы для индикации белка патогенности CagA *H. pylori*, содержащей отечественные иммунохимические компоненты.

На первом этапе работы были получены музейные культуры *H. pylori*, принадлежность которых к виду была подтверждена микробиологическими, биохимическими и молекулярно-генетическим 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* была выявлена у 6 культур, выделенных из зубодесневых карманов, и 6 культур – из биопсийного материала.

Поскольку целью работы являлось создание иммунохроматографической тест-системы для выявления высокопатогенных штаммов, содержащих белок CagA, на следующем этапе работы провели генотипирование выделенных штаммов.

По результатам генотипирования установили, 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 № 11 б (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 обнаружены не были. Для дальнейшей работы по созданию экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы для детекции белка патогенности CagA *H. pylori* был выбран высокопатогенный $cagA^+$ штамм – № 11б.

Перед тем, как перейти к созданию экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы был проведен детальный анализ отечественной и зарубежной литературы, а также патентной базы, касающихся вопросов разработки тест-систем, в основе которых лежит метод иммунохроматографического анализа.

В результате установили, что в качестве маркера для детекции результата иммунохроматографического анализа, наиболее оптимальными являются наночастицы коллоидного золота диаметром 25-30 нм. Самой приемлемой для обеспечения чувствительности тест-системы – концентрация антител в конъюгате на 10,0-20,0 % превышающая определенное «золотое число». Выбраны варианты буферных растворов, наиболее часто используемые для приготовления и отмывки

конъюгата НчКЗ с МкАТ, а также анализа разработанных образцов иммунохроматографических тест-систем [93].

Данные научных исследований были использованы при разработке экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы для выявления белка *CagA H. pylori*.

Первым этапом работы стала отработка методики получения препаратов наночастиц коллоидного золота размером 25-30 нм. За основу был взят цитратный метод Френса. В ходе экспериментальных исследований была разработана пошаговая методика с учетом условий внесения реагентов (ЗХВК и цитрата натрия), режимов перемешивания и температуры нагревания растворов [84]. В соответствии с данной методикой для приготовления НчКЗ заданного размера следует на магнитной мешалке установить температуру 300 °С и режим перемешивания 375 об·мин⁻¹; в колбу Эрленмейера добавить 49,23 см³ деионизированной воды комнатной температуры и внести «перемешивающий» стержень магнитной мешалки; колбу с водой установить на магнитную мешалку; через 6 мин (фиксируется секундомером от момента постановки колбы с содержимым на плитку и начала нагрева до начала стекания конденсата по стенкам дефлегматора и/или колбы) внести 0,058 мл 10,0 % раствора ЗХВК, кипятить 2 мин и внести 0,72 см³ 1,0 % раствора 5,5-водного цитрата натрия; при переходе цвета раствора с синего на красный изменить режим перемешивания на магнитной мешалке с 375 об·мин⁻¹ на 500 об·мин⁻¹ и снизить температуру с 300 °С до 200 °С, раствор кипятить еще 20 мин; раствор НчКЗ оставить при комнатной температуре на 18 ч с целью визуальной оценки качества приготовленного препарата. Контроль качества приготовленных препаратов НчКЗ провести на электронном трансмиссионном микроскопе. Препараты НчКЗ следует хранить при температуре 4 °С.

На следующем этапе работы определили «золотое число» для МкАТ к белку *CagA H. pylori*, для клонов НР-387 и НР-1811 («Биалекса», Россия), и выбрали оптимальную концентрацию для них с целью получения конъюгата с НчКЗ: для клона НР-387 – 18,4 мкг·см⁻³, для клона НР-1811 – 20,7 мкг·см⁻³.

Далее приготовили два варианта конъюгата НчКЗ размером 30 нм с МкАТ НР-1811 и МкАТ НР-387 в выбранной концентрации антител и сделали четыре варианта тест-систем: 1-й вариант – МкАТ НР-1811 и в конъюгате и в тестовой зоне; 2-й вариант – МкАТ НР-387 в конъюгате, МкАТ НР-1811 в тестовой зоне; 3-й вариант – МкАТ НР-1811 в конъюгате, в МкАТ НР-387 тестовой зоне; 4-й вариант – МкАТ НР-387 и в конъюгате и в тестовой зоне. По результатам исследования оптимальной оказалась комбинация антител в варианте № 2 (МкАТ НР-387 с НчКЗ в конъюгате и МкАТ НР-1811 в тестовой зоне), которая обеспечила более яркое окрашивание точки нанесения аналитических антител при тестировании с суспензией культуры *H. pylori*.

Сравнительный анализ четырех вариантов тест-систем, отличающихся различными комбинациями буферных растворов, используемых при их разработке, 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; 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 [112]. Данная комбинация обеспечивала плавное перемещение конъюгата по рабочей мембране тест-системы и, как результат, наибольшую интенсивность окраски тестовой и контрольной зон. Кроме этого, при тестировании буфера разгона не наблюдалось неспецифической реакции. Улучшение результата было связано с уменьшением концентрации сахарозы в составе конъюгата, увеличением концентрации БСА и добавлением Tween 20.

Мембраны, входящие в состав тест-системы, во многом влияют на чувствительность анализа. Показано, 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

чувствительность анализа. Влияние на вышеуказанные характеристики иммунохроматографических тест-систем изучили при использовании мембран двух фирм производителей: «Millipore» (США) и «MDI» (Индия).

Результаты исследования показали, что более качественный результат анализа обеспечивают мембраны фирмы «MDI»: мембрана для нанесения конъюгата «PT-R5» и нитроцеллюлозная мембрана «CNPf10μ».

Окончательный вариант экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы, который является результатом вышеописанных этапов работы, можно представить следующим образом: нитроцеллюлозная мембрана «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 мг·см⁻³ и антивидовые антитела козы против Ig мыши («Биалекса», Россия) в концентрации 10 мг·см⁻³ для формирования тестовой и контрольной зон тест-системы, соответственно [112].

Следующим этапом работы стала оценка специфичности и чувствительности изготовленного экспериментального образца тест-системы.

Специфичность разработанного образца иммунохроматографической тест-системы доказана при тестировании гетерогенной культуры *P. vulgaris* – окрашивания тестовой зоны при внесении культуры не отмечалось; отсутствовало окрашивание тестовой зоны при тестировании буфера разгона, а также *sagA*-негативных штаммов *H. pylori*.

При оценке чувствительности разработанного образца тест-системы со штаммом 11б *H. pylori*, позитивным по результатам молекулярно-генетического метода на ген *sagA*, порог чувствительности составил – 2,5·10⁹ м.к.·см⁻³. Низкий порог чувствительности тест-системы, направленной на детекцию белка *SagA* *H. pylori*, вполне объясним научными данными, изложенными в п. 1.4, о зависимости чувствительности иммунохроматографических тест-систем от расположения

антигена в микроорганизме, на выявление которого они направлены, и характеризует ее как качественную, а не количественную.

Одним из последних этапов работы стала оценка возможность применения лактата серебра для усиления окрашивания тестовой зоны иммунохроматографической тест-системы и повышения ее чувствительности. Возможность получения положительного результата обоснована данными литературы о способности солей серебра связываться с коллоидным золотом, вызывая восстановление катиона и образование оболочки металлического серебра вокруг наночастиц золота, способствующее усилению окрашивания [82].

Для этого разработали четыре варианта иммунохроматографических тест-систем, используя лактат серебра. При этом вариант № 1 представлял собой классическую версию иммунохроматографической тест-системы, без усиления лактатом серебра. В вариантах № 2 и № 3 модификации подвергался один из компонентов: нитроцеллюлозная рабочая мембрана – вариант № 2, мембрана для нанесения конъюгата – вариант № 3. Вариант № 4 характеризовался модификацией обоих компонентов тест-системы. После внесения пробы, содержащей *H. pylori*, появления точек в тестовой и в контрольной зонах, на них накладывали мембрану «PT-R5», предварительно пропитанную 0,5 М цитратным буфером с 3,0 % гидрохиноном, рН 4,0, и высушенную при комнатной температуре в течение суток. На наложенную мембрану для проявления реакции наносили 30 мкл буфера разгона.

Исследование по оценке влияния лактата серебра на чувствительность экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы для выявления белка CagA *H. pylori* показало, что обработка нитроцеллюлозной мембраны 0,075 % раствором лактата серебра (вариант № 2) с последующим наложением мембраны, пропитанной раствором гидрохинона, ведет к повышению чувствительности в четыре раза – снижению порога детекции белка CagA с $2,5 \cdot 10^9$ м.к.·см⁻³ до $62,5 \cdot 10^8$ м.к.·см⁻³ при тестировании культуры *H. pylori*, и с 0,5 мг·см⁻³ до 0,125 мг·см⁻³ при тестировании антигена «AGHPY-0100».

Данный прием, разработанный нами в процессе создания иммунохроматографической тест-системы, предназначенной для выявления патогенного белка CagA

H. pylori, можно использовать для повышения чувствительности других иммунохроматографических тест-систем, предназначенных для диагностики как инфекционных, так и неинфекционных антигенов.

На заключительном этапе работы провели тестирование разработанного образца иммунохроматографической тест-системы с биологическим материалом пациентов, в анамнезе которых были гастрит или язвенная болезнь желудка и которые не получали раньше антихеликобактерную терапию.

Для отбора пациентов протестировали их сыворотки на наличие антител к белку CagA *H. pylori* с помощью коммерческого набора для ДОТ-анализа «Хелико-экспресс» («ВЕКТОР-БЕСТ», Россия). По результатам анализа отобрали 50 серопозитивных лиц, которые приняли участие в дальнейшем исследовании.

Из 50 серопозитивных добровольцев отобрали 40 человек, у которых выделение чистой культуры *H. pylori* было проведено из всех видов биологического материала (из слизистой желудка, кала, материала зубодесневых карманов) бактериологическим методом и подтверждено молекулярно-генетическим и иммунохроматографическим методами, соответственно, на содержание гена *cagA* и белка CagA.

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 90,0 % случаев, в кале – в 35,0 %, в материале из зубодесневых карманов – в 52,5 % случаев. Из них молекулярно-генетическим методом ген *cagA*, ответственный за синтез бактерией белка патогенности CagA, в выделенных штаммах *H. pylori* был выявлен, соответственно, в 25,0 %, в 26,7 % и в 34,8 % случаев.

При тестировании образцов методом иммунохроматографического анализа с использованием разработанного экспериментального образца тест-системы белок CagA *H. pylori* был выявлен в биопсийном материале в 19,4 % случаев, в кале – в 20,0 % случаев, в материале зубодесневых карманов – в 13,0 %.

Результаты исследования показали, что не все пациенты, а только определенный процент лиц, нуждается в назначении антихеликобактерной терапии, поскольку их хеликобактериоз вызван высокопатогенными штаммами микроорганизма.

Кроме этого, в ходе работы провели сравнительную оценку иммунохроматографического и молекулярно-генетического методов анализа по способности выявлять наличие белка CagA *H. pylori* в материале, выделенном из слизистой оболочки желудка. Согласно критериям τ -b Кендалла и d Сомера, между данными методами существует прямая, сильная связь (корреляционная зависимость). Отсутствие статистически значимого различия и наличие прямой сильной корреляционной связи между данными молекулярно-генетического и иммунохроматографического анализа показывают, что эти два метода дают близкие значения результатов и могут быть использованы как альтернативные при диагностике патогенного белка CagA *H. pylori*.

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*, не имеющих аналогов на Российском рынке. Показана возможность определения данного белка *H. pylori* в различном биологическом материале пациентов с хроническими заболеваниями желудочно-кишечного тракта. Оценена высокая достоверность выявления CagA⁺ штаммов *H. pylori* в биологическом материале с использованием разработанного экспериментального образца, сравнимая с результатами молекулярно-генетического метода, позволяющая с высокой степенью вероятности отбирать пациентов для назначения рациональной антихеликобактерной терапии и последующего контроля эрадикации микроорганизма.

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 СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

АвАТ	– антивидовые антитела
АТ	– антитела
БР	– буфер разгона
БСА	– бычий сывороточный альбумин
БХ	– буфер хранения
ДНК	– дезоксирибонуклеиновая кислота
ЖКТ	– желудочно-кишечный тракт
ЗХВК	– золотохлористоводородная кислота
МкАТ	– моноклональные антитела
НчКЗ	– наночастицы коллоидного золота
ОР	– отмывающий раствор
ОСЧ	– особо чистый
ПкАТ	– поликлональные антитела
ПЦР	– полимеразная цепная реакция
ПЭГ	– полиэтиленгликоль
РРК	– раствор для разведения конъюгата
РРО	– раствор для разведения образцов
СББ	– сукцинатно-боратный буфер
СОЖ	– слизистая оболочка желудка
ФСБ	– фосфатный солевой буфер
ХЧ	– химически чистый
ЧДА	– чистый для анализа
СаgА ⁺	– СаgА-положительный штамм
СаgА ⁻	– СаgА-отрицательный штамм

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Андрюков, Б.Г. Современные методы лабораторной диагностики *H. pylori* / Б.Г. Андрюков, А.Ф. Лукьянчук, О.О. Сурина, В.М. Пекарская // Здоровье. Медицинская экология. Наука. – 2014. – № 1. – С. 37–43.
2. Warren, J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patient with gastritis and peptic ulceration / J.R. Warren, B.J. Marshall // *Lancet*. – 1983. – P. 1311–1315.
3. Маев, И.В. Клиническое значение инфекции *Helicobacter pylori* / И.В. Маев, А.А. Самсонов, Д.Н. Андреев, В.Б. Гречушников, Т.И. Коровина // *Клиническая медицина*. – 2013. – № 8. – С. 4–12.
4. Ивашкин, В.Т. Лечение инфекции *Helicobacter pylori*: мейнстрим и новации (Обзор литературы и резолюция Экспертного совета Российской гастроэнтерологической ассоциации, 19 мая 2017 г.) / В.Т. Ивашкин, И.В. Маев, Т.Л. Лапина и др. // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. – 2017. – Т. 27. – № 4. – С. 4–21.
5. Голубкина, Е.В. Некоторые эпидемиологические аспекты хеликобактериоза / Е.В. Голубкина, Б.Н. Левитан, А.Р. Умерова, Н.В. Камнева // *Астраханский медицинский журнал*. – 2018. – Т. 13. – № 2. – С. 6–16.
6. Файзуллина, Р.А. *H. pylori*-инфекция и новые возможности её эрадикации / Р.А. Файзуллина // *Практическая медицина*. – 2010. – № 1. – С. 18–23.
7. Состояние онкологической помощи населению России в 2018 г. / под ред. А.Д. Каприна, В.В. Старинского, Г.В. Петровой // М. : МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ "НМИЦ радиологии" Минздрава России, 2019. – 236 с.
8. Сеньчукова, М.А. О роли бактерий в этиологии и патогенезе злокачественный новообразований / М.А. Сеньчукова, А.А. Стадников // *Сибирский онкологический журнал*. – 2009. – № 2. – С. 79–85.

9. Лазебник, Л.Б. *Helicobacter pylori*: распространенность, диагностика, лечение / Л.Б. Лазебник, Ю.В. Васильев, П.Л. Щербаков и др. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2010. – № 2. – С. 3–7.

10. Статистика рака желудка [Электронный ресурс] / Режим доступа: <http://www.oncoforum.ru/o-rake/statistika-raka/statistika-raka-zheludka.html>.

11. Ивашкин, В.Т. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению инфекции *H. pylori* у взрослых / В.Т. Ивашкин, И.В. Маев, Т.Л. Лапина и др. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2018. – № 28. – С. 55–70.

12. Исаков, В.А. Хеликобактериоз / В.А. Исаков, И.В. Домарадский // М. : Медпрактика-М, 2003. – 412 с.

13. Климович, А.В. Создание иммунохимических реагентов для выявления CagA-антигена *Helicobacter pylori* и антител против него [Текст]: дис. ... канд. биол. наук: 14.03.09 / Климович Александр Владимирович. – Санкт-Петербург, 2010. – 129 с.

14. Citty, D.M. *Helicobacter pylori* genotypes in non atrophic gastritis are different of the found in peptic ulcer, premalignant lesions and gastric cancer in Colombia / D.M. Citty, M.G. Huertas, J.D. Martinez, R. Oliveros, H. Posso, M. M. Bravo, O. Orozco // Rev Med Chil. – 2002. – Vol. 130 (2). – P. 143–151.

15. Мирутко, Д.Д. *Helicobacter pylori*: патогенность, иммунный ответ организма и перспективы иммуномодулирующей терапии / Д.Д. Мирутко, А.В. Сапотницкий // Медицинский журнал. – 2005. – № 3. – С. 90–93.

16. Шкитин, В.А. Роль *Helicobacter pylori* в патологии человека / В.А. Шкитин, А.И. Шпирна // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2002. – Т. 4. – № 2. – С. 128–145.

17. Шургина, И.С. Инфекция *Helicobacter pylori*. Современный взгляд на проблему / И.С. Шургина, А.Н. Гуляев // Вестник Санкт-Петербургского университета. – 2007. – Вып.1. – С. 29–38.

18. Kikuchi, S. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection / S. Kikuchi, D.M. Dore // *Helicobacter*. – 2005. – Vol. 10. – P.1.

19. Suerbaum, S. *Helicobacter pylori* Infection / S. Suerbaum, P. Michetti // The New Eng J Med. – 2002. – Vol. 347. – P. 175–186.
20. Лапина, Т.Л. Современные методы диагностики и лечения инфекции *Helicobacter pylori* // Эффективная фармакотерапия. – 2018. – № 3. – С. 27–28.
21. Carneiro, F. Familial gastric carcinoma / Carneiro F., Wen X., Seruca R., Oliveira C. // Diagnostic Histopathology. – 2014. – Т. 20. – № 6. – С. 239–246.
22. Гладышев, Н.С. Желудочные и внежелудочные заболевания, связанные с инфекцией *Helicobacter pylori* / Н.С. Гладышев, А.С. Молостова, А.В. Сварваль // Здоровье – основа человеческого потенциала: проблемы и пути их решения. – 2019. – Т. 14. – № 2. – С. 535–548.
23. Fujiya, K. Different gastric mucosa and CagA status of patients in India and Japan infected with *Helicobacter pylori* / K. Fujiya, N. Nagata, T. Uchida // Digestive diseases and sciences. – 2014. – Т. 59. – № 3. – С. 631–637.
24. Сарсенбаева, А.С. Методы диагностики инфекции *Helicobacter pylori*: учеб. пособие / А.С. Сарсенбаева // Челябинск : изд. УМК, 2005. – 35 с.
25. Морозова, И.А. *Helicobacter pylori* и воспалительные процессы в желудке / И.А. Морозова // Альманах медицины. – 2006. – № 14. – С. 14–19.
26. Тослокоров, А.С. Роль хеликобактериоза в развитии заболеваний желудка / А.С. Тослокоров, С.А. Дергунова, Д.А. Александров // Инновационная наука. – 2019. – № 6. – С. 191–195.
27. Кудрявцева, Л.В. Биологические свойства *Helicobacter pylori* / Л.В. Кудрявцева // Альманах клинической медицины. – 2006. – С. 39–46.
28. Жуховицкий, В.Г. Микробиологическая диагностика хеликобактериоза / В.Г. Жуховицкий // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2008. – № 8. – С. 34–44.
29. Исаева, Г.Ш. Биологические свойства и вирулентность *Helicobacter pylori* / Г.Ш. Исаева, Р.И. Валиева // Клиническая микробиология и антимикробная терапия. – 2018. – Т. 20. – № 1. – С. 14–23.

30. Госманов, Р.Г. Хеликобактериоз / Р.Г. Госманов, Ф.М. Нургалиев, Р.М. Нургалиев // Ученые записки Казанской государственной академии ветеринарной медицины им. Н.Э. Баумана. – 2012. – Т. 210. – С. 68–74.

31. Файзуллина, Р.А. Факторы патогенности и вирулентности *Helicobacter pylori* и их роль в развитии хеликобактер-ассоциированной гастродуоденальной патологии / Р.А. Файзуллина, Е.В. Абдуллина // Практическая медицина. – 2011. – № 1 – С. 74–78.

32. Шургина, И.С. Инфекция *Helicobacter pylori* – современный взгляд на проблему / И.С. Шургина, А.Н. Гуляев // Вестник Санкт-Петербургского университета. – 2011. – Вып. 1 – С. 29–38.

33. Пальцев, М.А. Патологическая анатомия: национальное руководство / М.А. Пальцев, Л.В. Кактурский, О.В. Зайратьянц. – М. : ГОЭТАР-Медиа, 2017. – С. 512–517.

34. Макаренко, Е.В. Гены *vacA*, *cagA* и *babA* *Helicobacter pylori* у больных дуоденальной язвой и хроническим гастритом / Е.В. Макаренко, А.В. Воропаева // Вестник Витебского государственного медицинского университета. – 2004. – Т. 3. – № 1 – С. 74–77.

35. Шкитин, В.А. Роль *Helicobacter pylori* в патологии человека / В.А. Шкитин, А.И. Шпирна // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2002. – Т. 4. – № 2. – С. 128–145.

36. Lu, H. Duodenal ulcer promoting gene of *Helicobacter pylori* / H. Lu, P. Hsu, D.Y. Graham, Y. Yamaoka // Gastroenterology. – 2005. – 128(4). – P. 833–848.

37. Argent R.H. The presence of *dupA* in *Helicobacter pylori* is not significantly associated with duodenal ulceration in Belgium, South Africa, China or North America / R.H. Argent, A. Burette, V.Y. Miendje Deyi, J.C. Atherton // Clin Infect Dis. – 2007. – 45(9). – P. 1204–1206.

38. Schmidt, H.M. The prevalence of the duodenal ulcer promoting gene (*dupA*) in *Helicobacter pylori* isolates varies by ethnic group and is not universally associated with disease development: a case-control study / H.M. Schmidt, S. Andres, N.O. Kaakoush et al. // Gut Pathog. – 2009. – 1(1). – P. 5–13.

39. Пегашева, И.Л. Влияние факторов патогенности *Helicobacter pylori* (CagA и VacA) на предраковые изменения слизистой оболочки желудка у больных хроническим гастритом / И.Л. Пегашева, И.М. Павлович, А.В. Гордиенко и др. // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2019. – № 5. – С. 67–71.

40. Дехнич, Н.Н. Диагностика *Helicobacter pylori* и выбор эрадикационной терапии: результаты анкетирования врачей в различных регионах Российской Федерации / Н.Н. Дехнич, Р.С. Козлов, О.А. Саблин, Е.А. Прищепова // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии. – 2018. – № 28. – С. 33–41.

41. Войнован, И.Н. *H. pylori* как фактор риска рака желудка: доказательная база и стратегия первичной профилактики / И.Н. Войнован, Ю.В. Эмбутниекс, Д.В. Мареева и др. // Альманах клинической медицины. – 2019. – № 47. – С. 1–13.

42. Ивашкин, В.Т. Рекомендации по диагностике и лечению язвенной болезни / В.Т. Ивашкин, А.А. Шелтулин, Е.Н. Баранская и др. // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. – 2016. – Т. 26. – № 6. – С. 40–54.

43. Корниенко, Е.А. Пути повышения эффективности эрадикационной терапии у детей / Е.А. Корниенко, Н.И. Парлова // Материалы симпозиума «Объединение усилий в лечении язвенной болезни». – 2004. – С. 3–4.

44. Воропаева, А.В. Сравнение молекулярно-генетического, гистологического и иммуногистохимического методов для контроля эрадикации *Helicobacter pylori*-инфекции / А.В. Воропаева, Е.В. Воропаев, С.Л. Ачинович // Проблемы здоровья и экологии. – 2010. – № 2. – С. 29–33.

45. Суханов, А.В. Информативность дыхательного уреазного Хелик-теста в определении степени обсемененности *Helicobacter pylori* и патологических изменений слизистой оболочки желудка / А.В. Суханов, И.Э. Пикерский, А.В. Игнатова, Е.Н. Северникова // Сибирский медицинский журнал. – 2006. – № 7. – С. 11–16.

46. Кашин, С.В. Хронический гастрит, ассоциированный с *Helicobacter pylori*: современные стандарты диагностики и новые возможности эндоскопии

[Электронный ресурс] / С.В. Кашин, Е.Л. Никонов, Л.В. Кудрявцева // Вестник МЕДСИ. – 2017. – № 30. – Режим доступа: <https://vestnik.meds.ru/publications/194/>.

47. Лазебник, Л.Б. Ошибки и трудности в диагностике хеликобактериоза / Л.Б. Лазебник, В.И. Касьяненко, С.Г. Хомерики // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2012. – № 8. – С. 57–61.

48. Шубенкина, А.А. Оценка возможности использования биологического материала из зубодесневых карманов для неинвазивной диагностики хеликобактериоза: дипломная работа [Текст] / А.А. Шубенкина, рук. Н.В. Богачева. – Киров: ВятГУ, 2014. – 147 с.

49. Барышникова, Н.В. Актуальные проблемы диагностики хеликобактериоза / Н.В. Барышникова // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. – 2009. – № 2. – 50 с.

50. Can, F. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and determination of clarithromycin resistance by fluorescence in situ hybridization from formalin-fixed, paraffin-embedded gastric biopsy specimens / F. Can, Z. Yilmaz, M. Demirbilek // Can. J. Microbiol. – 2005. – № 51. – P. 569–573.

51. Velapatino, B. Validation of string test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infections / B. Velapatino // J. Clin Microbiol. – 2006. – № 44. – P. 976–980.

52. Паролова, Н.И. Сравнение неинвазивных методов диагностики *Helicobacter pylori*. Опыт применения дыхательного Хелик-аппарата у детей / Н.И. Паролова, Е.А. Корниенко, М.А. Дмитриенко, С.Э. Быков. – СПб. : СПб ГПМА, 2007. – С. 58–59.

53. Сурков, В.А. Уреазные дыхательные тесты на *Helicobacter pylori* / В.А. Сурков, Л.И. Гребенник // «Вісник СумДУ. Серія Медицина». – 2008. – Т. 1. – № 2. – С. 111–123.

54. Золотов, Ю.А. Химические тест-методы анализа / Ю.А. Золотов, В.М. Иванов, В.Г. Амелин. – М: Едиториал УРСС, 2002. – 304 с.

55. Берлина, А.Н. Определение хлорамфиникола в молоке / А.Н. Берлина, Н.А. Таранова, А.И. Жердев // Аналитическая и биоаналитическая химия. – 2013. – № 14. – С. 4997–5000.

56. Пивень, Н.В. Современные модификации иммунохимических диагностикомов: экспресс-методы / Н.В. Пивень, А.И. Бураковский // Иммунопатология, аллергия, инфектология. – 2012. – № 3. – С. 6–12.

57. Башарова, Л.А. Создание индикаторных иммунохроматографических элементов для выявления риккетсий Бергетта / Л.А. Башарова, С.П. Ярков, С.И. Третьяков, В.Н. Злобин // Проблемы особо опасных инфекций. – 2013. – № 3. – С. 79–81.

58. Ford, A.C. Epidemiology of *Helicobacter pylori* infection and public health implications / A.C. Ford, A.T. Axon // *Helicobacter*. 2010. – 15 (Suppl. 1). – P. 1–6.

59. Бызова, Н.А. Разработка иммунохроматографических тест-систем для экспрессной детекции липолисахаридного антигена и клеток возбудителя бруцеллеза крупного рогатого скота / Н.А. Бызова, А.В. Жердев, С.З. Ескеидирова и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – Т. 48. – № 6. – С. 653–661.

60. Петракова, А.В. Иммунохроматографическая тест-система для детекции Т-2 токсина / А.В. Петракова, А.Е. Урусов, М.В. Возняк и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2015. – Т. 51. – № 6. – С. 616–623.

61. Титов, А.А. Разработка и оптимизация иммунохроматографических тестов для выявления ботулинических токсинов / А.А. Титов, И.В. Шиленко, А.А. Морозов и др. // Прикладная биохимия и микробиология. – 2012. – Т. 48. – № 2. – С. 249–256.

62. Федюкина, Г.Н. Получение компонентов иммунохроматографического теста для выявления возбудителей сапа и мелиоидоза / Г.Н. Федюкина, С.С. Ветчинин, Е.В. Баранова и др. // Биотехнология. – 2015. – № 1. – С. 85–92.

63. Шиленко, И.В. Разработка мультианалитного иммунохроматографического теста для выявления ботулинических токсинов / И.В. Шиленко, А.А. Титов, С.П. Ярков, В.Н. Злобин // Проблемы особо опасных инфекций. – 2011. – Вып. 109. – С. 68–70.

64. Богачева, Н.В. Разработка иммунохроматографической моноклональной тест-системы для выявления *Yersinia pseudotuberculosis* серогруппы I / Н.В. Богачева, Г.Д. Елагин, Д.В. Печенкин и др. // Проблемы особо опасных инфекций. – 2016. – № 2 – С. 65–68.

65. Бровкина, А.Н. Контроль возбудителей кишечных инфекций на основе иммунохроматографического метода / А.Н. Бровкина // Научный журнал КубГАУ. – 2011. – № 2 – С. 16–21.

66. Скопинская, С.Н. Использование гидрозолей гексацианоферрата железа для создания диагностических иммунохроматографических тест-систем / С.Н. Скопинская, С.П. Ярков, В.Н. Злобин, Х.Х. Валиев // Вестник РАМН. – 2012. – № 3. – С. 80–86.

67. Мусихин, С.Ф. Сенсоры на основе металлических и полупроводниковых коллоидных наночастиц для биомедицины и экологии / С.Ф. Мусихин, О.А. Александра, В.В. Лучинин и др. // Биотехносфера. – 2013. – Т. 26. – № 2. – С. 2–16.

68. Faulk, W. An immunocolloid method for the electron microscope / W. Faulk, G. Taylor // *Immunochemistry*. – 1971. – Vol. 8. – P. 1081–1083.

69. Safenkova, I.V. Factors influencing the detection limit of the lateral-flow sandwich immunoassay: a case study with potato virus X / I.V. Safenkova, A.V. Zherdev, B.B. Dzantiev // *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. – 2012. – V. 403. – № 6. – P. 1595–1605.

70. Makhsin, S.R. The effects of size and synthesis methods of gold nanoparticle-conjugated M alpha HIgG(4) for use in an immunochromatographic strip test to detect brugian filariasis / S.R. Makhsin, K.A. Razak, R. Noordin et al. // *Nanotechnology*. – 2012. – V. 23. – № 49. – P. 495–603.

71. Таранова, Н.А. Комплексы антител с нанодисперсными носителями: синтез, свойства и применение в иммунохроматографии: дис. ... канд. хим. наук.: 03.01.04 / Таранова Надежда Алексеевна – М, 2014. – 206 с.

72. Бызова, Н.А. Разработка иммунохроматографической тест-системы для детекции антигенов *H. pylori* / Н.А. Бызова, А.В. Жердев, П.Г. Свешников и др. // *Прикладная биохимия и микробиология*. – 2015. – Т. 51. – № 5. – С. 520–530.

73. Бызова, Н.А. Иммунохроматографическая и латекс-агглютинационная система детекции дифтерийного токсина / Н.А. Бызова, В.В. Свиридов, Н.Ф. Гаврилов и др. // *Биоорганическая химия*. – 2009. – № 35. – С. 533–541.

74. Yunping, P. Study and evaluation of Wondfo rapid diagnostic kit based on nano-gold immunochromatography assay for diagnosis of Plasmodium falciparum / P. Ynping, J. Wu, J. Wang // Parasitology Research. – 2012. – V. 110. – № 4. – P. 1421–1425.

75. Дрыгин, Ю.Ф. Высокочувствительный иммунохроматографический экспресс-метод определения зараженности растений вирусом табачной мозаики / Ю.Ф. Дрыгин, А.Н. Блинцов, А.П. Осипов и др. // Биохимия. – 2009. – Т. 74. – № 9. – С. 986–993.

76. Il-Hoon Cho. Lateral-flow enzyme immunocon centration for rapid detect ion of Listeria monocytogenes / Il-Hoon Cho, Joseph Irudayaraj // Analytical and bioanalytical chemistry. – 2013. – V. 405. – № 10. – P. 3313–3319.

77. Drygin, Y.F. Highly sensitive field test lateral flow immunodia gnostics of PVX infection / Y.F. Drygin, A.N. Blintsov, V.G. Grigorenko // Applied Microbiology and Biotechnology. – 2012. – V.93. – № 1. – P. 179–189.

78. Сотников, Д.В. Иммунохроматографическая серодиагностика туберкулеза с использованием конъюгата коллоидное золото-антиген / Д.В. Сотников, А.В. Жердев, В.Г. Авиденко, Б.Б. Дзантиев // Биотехнология. – 2015. – № 2. – С. 76–81.

79. Frens, G. Controlled Nucleation for the Regulation of the Particle Size in Monodisperse Gold Suspensions/ G. Frens // Nat. Phys. Sci. – 1973. – V. 241. – № 105. – P. 20–22.

80. Dressler, D. Botulinum toxin antibody testing: comparison between the immunoprecipitation assay and the mouse diaphragm assay / D. Dressler, G. Dirnberger / European Neurology. – 2001. – V. 45. – № 4. – P. 257–260.

81. Дыкман, Л.А. Золотые наночастицы. Синтез, свойства, биомедицинское применение / Л.А. Дыкман, В.А. Богатырев, С.Ю. Щеголев, Н.Г. Хлебцов // М. : Наука, 2008. – С. 195–196.

82. Дыкман, Л.А. Наночастицы золота: получение, функционализация, использование в биохимии и иммунохимии / Л.А. Дыкман, В.А. Богатырев // Успехи химии. – 2007. – Т. 76. – Вып. 2. – С. 199–213.

83. Бызова, Н.В. Влияние состава конъюгата коллоидного золота с белками на эффективность их использования в иммунохроматографическом анализе / Н.В. Бызова, Д.В. Сотников // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 3. – С. 1–8.

84. Parolo, C. Enhanced lateral flow immunoassay using gold nanoparticles loaded with enzymes / C. Parolo, A. de la Escosura-Muñiz, A. Merkoçi // Biosensors and Bioelectronics. – 2013. – V. 40. – P. 412–416.

85. Евразийский пат. 027196 Российская Федерация, МПК G01N 33/532, G01N 33/551 G01N 21/78. Методика проведения количественного мультипараметрического иммунохроматографического анализа с использованием нескольких контрольных зон / И.В. Сафенкова, В.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев ; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии имени А.Н. Баха Российской академии наук (ИНБИ РАН) – № 201301195 ; заявл. 22.11.2013 ; опубл. 30.06.2017, Бюл. № 6.

86. Евразийская заявка 201301116 Российская Федерация, МПК G01N 33/532, G01N 33/551. Способ иммобилизации нескольких конъюгатов с меткой для проведения иммунохроматографического анализа / И.В. Сафенкова, Н.А. Бызова, А.В. Жердев, Б.Б. Дзантиев ; заявитель и патентообладатель Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биохимии имени А.Н. Баха Российской академии наук (ИНБИ РАН) – № 2013000147 ; заявл. 31.10.2013 ; опубл. 30.12.2015.

87. Vyzova, N.A. Influence of the composition of colloidal gold conjugates with proteins on the efficiency of their use with the immunoassay analysis / N.A. Vyzova, D.V. Sotnikov // Modern problems of science and education. – 2013. – № 3. – P. 1–8.

88. Урусов, А.Е. Изучение зависимости аналитических параметров иммунохроматографических тест-систем от режима иммобилизации иммунореагентов на мембраны / Урусов А. Е., Жердев А. В. // Современные проблемы науки и образования. – 2013. – № 3. – С. 25–31.

89. Воропаева, А.В. Сравнение молекулярно-генетического, гистологического и иммуногистохимического методов для контроля эрадикации *Helicobacter*

pylori-инфекции / А.В. Воропаева, Е.В. Воропаев, С.Л. Ачинович // Проблемы здоровья и экологии. – 2010. – № 2. – С. 29–33.

90. Голубев, С.С. Метод калибровочных кривых для иммунохроматографических экспресс-тестов / С.С. Голубев, Ю.А. Кудеяров, В.М. Малюченко и др. // Законодательная и прикладная метрология. – 2012. – Т. 119. – № 4. – С. 29–32.

91. Моноклональные антитела к *Helicobacter pylori* [Электронный ресурс] // Режим доступа: <http://www.bialexa.ru/products/monoclonalantibodies/product/monoklonalnye-antitela-k-belku-CagA-helicobacter-pylori>.

92. Кудайбергенова, Э.Б. Получение конъюгатов антител и золотых наночастиц для использования в иммунохроматографическом анализе / Э.Б. Кудайбергенова // Республиканская научно-теоретическая конференция «Сейфуллинские чтения – 9: Новый вектор развития высшего образования и науки». – 2013. – Т. 2. – Ч. 2. – С.121.

93. 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.

94. Урусов, А.Е. Разработка и сравнительная характеристика систем экспрессного иммунохимического определения микотоксинов : автореф. дис. ... канд. хим. наук : 03.01.04 / Урусов Александр Евгеньевич. М., 2016. – 27 с.

95. Сотников, Д.В. Применение иммунохроматографического анализа для серодиагностики бруцеллеза крупного рогатого скота / Д.В. Сотников, Н.А. Бызова, Н.П. Староверова и др. // Российский ветеринарный журнал. Сельскохозяйственные животные. – 2013. – № 3. – С. 15–18.

96. Пат. 2518304 Российская Федерация, МПК С12N 1/20 Двухфазная питательная среда для тонкослойного культивирования *H. pylori* и способ его осуществления / В.А. Алешкин, Г.Ш. Исаева, Е.П. Селькова, С.С. Афанасьева ; заявитель и патентообладатель Федеральное Бюджетное учреждение науки "Московский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им.

Г.Н. Габричевского" Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека. – № 2012125394 : заявл. 20.06.2012 ; опубл. 10.06.2014, Бюл. № 16.

97. Теппер, Е.З. Практикум по микробиологии / Е.З. Теппер, под ред. В.К. Шильниковой. – М. : Дрофа, 2004. – 138 с.

98. Золотарев, А.Г. Световая микроскопия микроорганизмов: практическое руководство / А.Г. Золотарев, Е.В. Пименов, Д.А. Девришов. – М. : «Агровет», 2012. – 258 с.

99. Акопян, И.Г. Методы диагностики хеликобактериоза: учеб. пособие / И. Г. Акопян, Н. В. Барышникова, Т. М. Григорян и др, под ред. А. В. Козлова, В. П. Новиковой. – СПб. : «Издательство «Диалект», 2008. – 88 с.

100. Инструкция по применению «Комплекта реагентов для ПЦР-амплификации ДНК с детекцией в режиме реального времени (формат «Real-time») – М. : ООО «ДНК-технологии», 2013. – 46 с.

101. Методика проведения исследования клинического материала (биоптат слизистой желудка и двенадцатиперстной кишки) на наличие ДНК Хеликобактер пилори (*Helicobacter pylori*) методом ПЦР / Научно-производственная фирма «Литех». – М.: «Литех», 2013. – 8 с.

102. Lawson, A.B., Browne, W.J., Vidal Rodeiro C.L. Disease mapping with WinBugs and MLwiN // John Wiley and Sons. – Wiley, 2003. – p. 277.

103. Халафян, А.А. Современные статистические методы медицинских исследований. – М. : Издательство ЛКИ, 2008. – 320 с.

104. Гланц, С. Медико-биологическая статистика / Стентон Гланц; пер. с англ. Ю. А. Данилова; под ред. Н. Е. Бузикашвили и Д. В. Самойлова. – М.: Практика, 1999. – 459 с.

105. Гржибовский, А. М. Анализ номинальных данных (независимые наблюдения) / А. М. Гржибовский // Экология человека. – 2008. – № 6. – С. 58.

106. Real-Time PCR (ПЦР в реальном времени): методическое пособие для врачей [Электронный ресурс] // Научно-производственная фирма «Литех». – М.: «Литех», 2013. – Режим доступа: http://www.lytech.ru/articles_129.html.

107. Богачева, Н.В. Генотипирование культур *H. pylori*, выделенных из различного биологического материала добровольцев с хроническими заболеваниями желудочно-кишечного тракта / Н.В. Богачева, А.А. Шубенкина // Медицина: актуальные вопросы и тенденции развития. Материалы VII научно-практической конференции. – 2016. – С. 26–32.

108. Исаева, Г.Ш. Роль *Helicobacter pylori* в патогенезе злокачественных трансформаций эпителия слизистой оболочки желудка / Г.Ш. Исаева, О.К. Поздеев // Казанский медицинский журнал. – 2003. – Т. 84. – № 6. – С. 437–441.

109. Файзуллина, Р.А. Факторы патогенности и вирулентности *H. pylori* и их роль в развитии хеликобактер-ассоциированной гастродуоденальной патологии [Электронный ресурс] / Р.А. Файзуллина, Е.В. Абдуллина // Практическая медицина. – 2011. – № 1. – Режим доступа: <http://pmarchive.ru/factory-patogennosti-i-virulentnosti-helicobacter-pylori-i-ix-rol-v-razvitii-xelikobakter-associirovannoj-gastroduodenalnoj-patologii/>.

110. 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. Богачева, 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.

111. Hermanson, G.T. Bioconjugate Techniques / G.T. Hermanson // Amsterdam: Acad. Press, Elsevier, 2008. – 900 p.

112. Пат. 2642588 Российская Федерация, МПК G01N 33/543, G01N 33/577. Иммунохроматографическая тест-система для выявления патогенных штаммов *Helicobacter pylori* / Н.В. Богачева, 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.

113. 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.

114. Смирнова, Д.Н. Обоснование чувствительности иммунохроматографического анализа в зависимости от локализации детектируемого антигена / Д.Н. Смирнова, Н.В. Богачева // Вестник Пермского университета. Серия Биология. – 2019. – № 3. – С. 309–314.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ АВТОРА

В издания, 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. Богачева // 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. Богачева, 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. Богачева, **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. 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.

Приложение А

Результаты микробиологической и биохимической идентификации культур, полученные при первичном посеве биологического материала из зубодесневых карманов на питательную среду

Номер пробы	Морфология колоний	Результаты микроскопии	Результаты тестов		
			oxi	kat	ure
1з	Сплошной газон	Гр(-) палочки	+	+	+
2з	Колонии правильной округлой формы, размером 1 мм, каплевидные, кремового цвета, блестящие, с ровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Гр(-) палочки	+	+	+
	Колонии неправильной формы, размером 5 мм, кремового цвета, конусовидные, блестящие, с неровными краями, зернистые, плотной консистенции	Н	Н	Н	Н
	Колонии неправильной формы, размером 5-10 мм, плоские, кремового цвета, блестящие, с неровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Н	Н	Н	Н
3з	Колонии правильной округлой формы, размером 1 мм, кремового цвета, каплевидные, блестящие, с ровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Гр(-) палочки	+	+	+
	Колонии правильной округлой формы, размером 5 мм, кремового цвета, конусовидные, блестящие, с неровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Н	Н	Н	Н
4з	Колонии правильной округлой формы, размером 1 мм, каплевидные, блестящие, с ровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Гр(-) палочки	+	+	+
	Колонии неправильной формы, размером 10 мм, кремового цвета, плоские (есть перетяжки), блестящие, шероховатые, с неровным краем, зернистые, плотной консистенции	Н	Н	Н	Н
	Колонии неправильной формы, размером 5-8 мм, кремового цвета, с блестящим соском посередине и матовыми валиками по периферии, с неровным краем, зернистые, плотной консистенции	Н	Н	Н	Н

Продолжение Приложения А

Номер пробы	Морфология колоний	Результаты микроскопии	Результаты тестов		
			oxi	kat	ure
5з	Колонии правильной округлой формы, размером 5 мм, кремового цвета, плоские, блестящие, с ровным краем, зернистые, плотной консистенции	Н	Н	Н	Н
	Колонии правильной округлой формы, размером 1 мм, каплевидные, кремового цвета, блестящие, с ровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Гр(-) палочки	+	+	+
	Колонии правильной формы, размером 5 мм, кремового цвета, плоские, матовые, с ризоидным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Н	Н	Н	Н
6з	Колонии неправильной формы, размером 1-2 мм, плоские, блестящие, молочного цвета, с неровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Н	Н	Н	Н
	Колонии неправильной формы, размером 2-3 мм, плоские, кремового цвета, с точкой посередине, блестящие, с неровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Н	Н	Н	Н
	Колонии правильной округлой формы, размером 1 мм, кремового цвета, каплевидной формы, блестящие, с ровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Гр(-) мелкие палочки и крупные кокки	+	+	+
7з	Колонии правильной округлой формы, размером 2-3 мм, молочного цвета, каплевидные, блестящие, с неровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Н	Н	Н	Н
	Колонии правильной округлой формы, размером 2-3 мм, кремового цвета, каплевидные, блестящие, с неровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Н	Н	Н	Н
	Колонии неправильной формы, размером 3 мм, плоские, кремового цвета, матовые, с неровным краем, непрозрачные, морщинистые, плотной консистенции	Н	Н	Н	Н

Продолжение Приложения А

Номер пробы	Морфология колоний	Результаты микроскопии	Результаты тестов		
			oxi	kat	ure
	Колонии правильной округлой формы, размером 1 мм, кремового цвета, каплевидной формы, блестящие, с ровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Гр(-) палочки	-	-	-
8з	Колонии правильной округлой формы, размером 2-3 мм, молочного цвета, каплевидной формы, блестящие, с ровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Н	Н	Н	Н
	Колонии правильной округлой формы, размером 2-3 мм, кремового цвета, плоские, блестящие, складчатые, с неровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Н	Н	Н	Н
	Колонии правильной округлой формы, размером 1 мм, кремового цвета, каплевидной формы, блестящие, с ровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Гр(-) кокки	+	+	+
	Колонии правильной формы, размером 2-3 мм, каплевидные, с точкой посередине, матовые, с неровным краем, зернистые, плотной консистенции	Н	Н	Н	Н
9з	Колонии правильной округлой формы, размером 1 мм, кремового цвета, каплевидной формы, блестящие, с ровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Гр(-) палочки	+	+	+
	Колонии правильной округлой формы, размером менее 1 мм, кремового цвета, каплевидной формы, блестящие, с ровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Н	Н	Н	Н
10з	Колонии правильной округлой формы, размером 1 мм, кремового цвета, каплевидной формы, блестящие, с ровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Гр(-) палочки	+	+	+
	Колонии правильной округлой формы, размером менее 1 мм, кремового цвета, каплевидной формы, блестящие, с ровным краем, непрозрачные	Н	Н	Н	Н

Продолжение Приложения А

Номер пробы	Морфология колоний	Результаты микроскопии	Результаты тестов		
			oxi	kat	ure
11з	Колонии неправильной формы, размером 10 мм, кремового цвета, плоские, блестящие, складчатые, с неровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Н	Н	Н	Н
	Колонии правильной формы, размером 1-2 мм, плоские, матовые, с ровным краем, непрозрачные, кремового цвета, плотной консистенции	Н	Н	Н	Н
	Колонии правильной округлой формы, размером 1 мм, кремового цвета, каплевидной формы, блестящие, с ровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Гр(-) палочки	+	+	+
12з	Колонии неправильной формы, размером 5-20 мм, плоские, кремового цвета, с кольцом посередине, матовые, складчатые, с неровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Н	Н	Н	Н
	Колонии неправильной формы, размером 5 мм, плоские, кремового цвета, блестящие, с ровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Н	Н	Н	Н
	Колонии правильной округлой формы, размером 1 мм, кремового цвета, каплевидной формы, блестящие, с ровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Гр(-) палочки	-	-	-
Примечания:					
1. «+» – положительный результат тестирования; «-» – отрицательный результат тестирования.					
2. «Н» – исследование не проводилось, микроорганизм не выделен.					
3. Гр(-) – грамотрицательная окраска					

Приложение Б

Результаты микробиологической и биохимической идентификации культур, полученные при первичном посеве биопсийного материала на питательную среду

Номер пробы	Морфология колоний	Результаты микроскопии	Результаты тестов		
			oxi	kat	ure
16	Нет роста	Н	Н	Н	Н
26	Нет роста	Н	Н	Н	Н
36	Колонии правильной округлой формы, размером 1 мм кремового цвета, каплевидной формы, блестящие, с ровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Гр(-) палочки	+	+	+
46	Колонии правильной округлой формы, размером 1 мм, кремового цвета, каплевидной формы, блестящие, с ровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Гр(-) палочки	+	+	+
56	Колонии правильной округлой формы, размером 1 мм, кремового цвета, каплевидной формы, блестящие, с ровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Гр(-) палочки	+	+	+
66	Нет роста	Н	Н	Н	Н
76	Колонии правильной округлой формы, размером 1 мм, кремового цвета, каплевидной формы, блестящие, с ровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Гр(-) палочки	+	+	+
86	Колонии правильной округлой формы, размером 1 мм, кремового цвета, каплевидной формы, блестящие, с ровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Гр(-) палочки	+	+	+
96	Нет роста	Н	Н	Н	Н
106	Колонии правильной округлой формы, размером 1 мм, кремового цвета, каплевидной формы, блестящие, с ровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Гр(-) палочки	+	+	+

Продолжение Приложения Б

Номер пробы	Морфология колоний	Результаты микроскопии	Результаты тестов		
			oxi	kat	ure
116	Колонии правильной округлой формы, размером 1 мм, кремового цвета, каплевидной формы, блестящие, с ровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Гр(-) палочки	+	+	+
126	Колонии правильной округлой формы, размером 1 мм, кремового цвета, каплевидной формы, блестящие, с ровным краем, непрозрачные, плотной консистенции	Гр(-) палочки	+	+	+
<p>Примечания:</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. «+» – положительный результат тестирования. 2. «-» – отрицательный результат тестирования. 3. «Н» – исследование не проводилось, микроорганизм не выделен. 4. Гр(-) – грамотрицательная окраска 					

Приложение В

Результат исследования проб добровольцев на наличие *H. pylori* с использованием бактериологического и молекулярно-генетического методов

№ доброво- вольца	Результат исследования ... методом на наличие ... в биологическом материале					
	бактериологическим			молекулярно-генетическим		
	<i>H. pylori</i>			патогенного белка CagA <i>H. pylori</i>		
	в слизистой желудка	в кале	в зубодесневых карманах	в слизистой желудка	в кале	в зубодесневых карманах
1	+	+	-	-	-	Н
2	+	+	+	+	-	+
3	+	-	-	-	Н	Н
4	+	-	-	-	Н	Н
5	+	+	+	-	+	-
6	+	-	-	-	-	-
7	+	-	+	+	Н	+
8	+	-	-	-	Н	Н
9	+	-	+	-	Н	-
10	+	-	+	+	Н	+
11	+	+	-	-	-	Н
12	+	-	-	-	Н	Н
13	+	+	+	+	+	+
14	+	-	-	-	Н	Н
15	+	+	-	-	-	Н
16	+	-	+	-	Н	-
17	-	-	+	Н	Н	-
18	+	-	+	-	Н	-
19	+	+	+	+	-	-
20	+	-	-	-	Н	Н
21	-	-	+	Н	Н	+
22	+	-	-	-	Н	Н
23	+	-	-	+	Н	Н
24	+	-	+	-	Н	-
25	+	+	+	+	-	+
26	+	-	-	-	Н	Н
27	-	+	-	Н	-	+

Продолжение Приложения В

№ добро- вольца	Результат исследования ... методом на наличие ... в биологическом материале					
	бактериологическим			молекулярно-генетическим		
	<i>H. pylori</i>			патогенного белка CagA <i>H. pylori</i>		
28	в слизистой желудка	в кале	в зубодесневых карманах	в слизистой желудка	в кале	в зубодесневых карманах
29	+	-	+	-	Н	-
30	-	-	+	Н	Н	-
31	+	+	-	+	+	Н
32	+	-	-	-	Н	Н
33	+	+	-	-	-	Н
34	+	-	+	-	Н	-
35	+	+	+	-	-	-
36	+	+	+	-	-	-
37	+	-	+	-	Н	-
38	+	-	-	-	Н	Н
39	+	+	+	+	+	+
40	+	-	-	-	Н	Н

Примечания:
1 «+» – положительный результат тестирования.
2 «-» – отрицательный результат тестирования.
3 «Н» – исследование не проводилось, микроорганизм не выделен

Приложение Г
Результат исследования проб добровольцев на наличие белка CagA
***H. pylori* с использованием экспериментального образца**
иммунохроматографической тест-системы

№ доброво- льца	Результат исследования на наличие белка CagA <i>H. pylori</i> с использованием экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы культур, выделенных из...		
	слизистой желудка	кала	зубодесневых карманов
1	-	-	Н
2	+	-	-
3	-	Н	Н
4	-	Н	Н
5	-	+	-
6	-	-	-
7	+	Н	+
8	-	Н	Н
9	-	Н	-
10	+	Н	+
11	-	-	Н
12	-	Н	Н
13	-	-	-
14	-	Н	Н
15	-	-	Н
16	-	Н	-
17	Н	Н	-
18	-	Н	-
19	+	-	-
20	-	Н	Н
21	Н	Н	-
22	-	Н	Н
23	+	Н	Н
24	-	Н	-
25	-	-	-
26	-	Н	Н
27	Н	-	-
28	-	Н	-
29	-	Н	-
30	Н	Н	-
31	+	+	Н
32	-	Н	Н
33	-	-	Н
34	-	Н	-
35	-	-	-
36	-	-	-
37	-	Н	-
38	-	Н	Н
39	+	+	+
40	-	Н	Н

Примечания:

1. «+» – положительный результат тестирования.
2. «-» – отрицательный результат тестирования.
3. «Н» – исследование не проводилось, микроорганизм не выделен

Приложение Д

Акты о внедрении результатов диссертации

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ
федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования
«Вятский государственный университет»
(ВятГУ)
г. Киров

СПРАВКА (АКТ)

о внедрении основных научных результатов диссертации соискателя ученой степени

Смирновой Дарьи Николаевны

фамилия, имя, отчество соискателя

Настоящая справка (акт) подтверждает, что материалы диссертации Смирновой Дарьи Николаевны на тему «Разработка экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы для выявления белка патогенности CagA *Helicobacter pylori*», представленной на соискание ученой степени кандидата биологических наук, используются в **образовательной деятельности** федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Вятский государственный университет».

В частности, в работу внедрены:

№ п/п	Результат исследования	Область применения	Подтверждающий документ
1.	Экспериментальный образец иммунохроматографической тест-системы для выявления CagA-положительных штаммов <i>Helicobacter pylori</i>	Учебная дисциплина «Основы иммунологии и фармакологии»	Рабочая программа учебной дисциплины «Основы иммунологии и фармакологии»

Использование вышеперечисленных выводов и предложений диссертации Смирновой Дарьи Николаевны в образовательной деятельности по направлению подготовки 06.03.01 Биология (направленность «Микробиология») способствует повышению качества подготовки обучающихся.

Материалы диссертации обсуждены и одобрены для внедрения на расширенном заседании кафедры микробиологии, протокол от 07.07.2020 г. № 6.



Проректор по образованию

М.П.

Директор института биологии и биотехнологии

подпись

С.В. Никулин

подпись

Е.А. Мартинсон



Федеральное государственное бюджетное
образовательное учреждение высшего образования
"Кировский государственный медицинский университет"
Министерства здравоохранения Российской Федерации
(ФГБОУ ВО Кировский ГМУ Минздрава России)

www.kirovgma.ru
e-mail: med@kirovgma.ru
ул. К. Маркса, 112, г. Киров, 610998
тел.: (8332) 64-09-76; тел./факс: (8332) 64-07-34
ИНН/КПП 4346010151/434501001
ОКПО 10942252, ОГРН 1034316504540



УТВЕРЖДАЮ
Проректор по учебной работе
ФГБОУ ВО Кировский ГМУ
Минздрава России

Е.Н. Касаткин

« 27 » июля 20 20 года

24.07.2020 № 1973-01-24

На № _____

О внедрении в образовательный процесс

АКТ ВНЕДРЕНИЯ

в учебный процесс результатов научно-квалификационной работы
Смирновой Дарьи Николаевны, аспиранта 3 года обучения
ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет»
на тему: «Разработка экспериментального образца иммунохроматографической
тест-системы для выявления белка патогенности CagA *Helicobacter pylori*»

Мы, нижеподписавшиеся, комиссия в составе: председателя – заведующий кафедрой микробиологии и вирусологии, кандидат медицинских наук, доцент Колеватых Екатерина Петровна и членов – профессор кафедры микробиологии и вирусологии, доктор медицинских наук, доцент Богачева Наталья Викторовна, доцент кафедры микробиологии и вирусологии, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник Поярков Юрий Александрович удостоверяем, что экспериментальный образец иммунохроматографической тест-системы для выявления белка патогенности CagA *Helicobacter pylori*, учебно-методическое пособие по применению иммунохроматографических тест-систем для выявления микробиологических, химических агентов и биомаркеров соматических заболеваний, а также презентация по принципу работы тест-систем, используются при обучении студентов 3-го и 4-го курса, педиатрического и лечебного факультета, по специальностям 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 ФГБОУ ВО Кировский ГМУ Минздрава России.

Председатель комиссии:

Колеватых Е.П.

Члены комиссии:

Богачева Н.В.

Поярков Ю.А.