

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Смирнова Д.Н.¹, Богачева Н.В.^{1,2}, Петров С.Б.², Тунева Н.А.²

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ОЦЕНКА РЕЗУЛЬТАТОВ ВЫЯВЛЕНИЯ CAGA-ПОЛОЖИТЕЛЬНЫХ ШТАММОВ *HELICOBACTER PYLORI* МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИМ И ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКИМ МЕТОДАМИ В РАЗЛИЧНОМ БИОЛОГИЧЕСКОМ МАТЕРИАЛЕ

¹ФГБОУ ВО «Вятский государственный университет», 610000, г. Киров, Россия;

²ФГБОУ ВО «Кировский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, 610998, г. Киров, Россия

Выполнен сравнительный анализ выявления CagA-положительных штаммов *H. pylori* иммунохроматографическим и молекулярно-генетическим методами. Использованы штаммы *H. pylori*, выделенные от лиц с заболеваниями желудочно-кишечного тракта. Иммунохроматографический метод реализован с помощью разработанного экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы для выявления белка CagA *H. pylori* в различном биологическом материале. Определение гена патогенности cagA *H. pylori* осуществлено с использованием тест-системы «Хеликопол СА» («Литех», Россия). Оценку сопоставимости результатов выявления CagA-положительных штаммов *H. pylori* проводили, используя статистические методы: Монте-Карло, расчет критерия хи-квадрат (χ^2) и коэффициентов τ -b Кендалла и d Сомера. Статистический анализ выполнен с применением программных пакетов «Microsoft Office Excel», «Statistica 10.0» и «WinBUGS 1.4.0.». Показано отсутствие статистически значимого различия и наличие прямой сильной корреляционной связи между результатами выявления CagA-положительных штаммов молекулярно-генетическим и иммунохроматографическим методами, что свидетельствует о том, что эти методы позволяют получить близкие по значимости результаты при идентификации высокопатогенных штаммов *H. pylori*.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*; иммунохроматографическая тест-система; ПЦР-анализ; хеликобактериоз; статистический анализ.

Для цитирования: Смирнова Д.Н., Богачева Н.В., Петров С.Б., Тунева Н.А. Сравнительная оценка результатов выявления CagA-положительных штаммов *Helicobacter pylori* молекулярно-генетическим и иммунохроматографическим методами в различном биологическом материале. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67 (1): 48-52. DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-48-52>

Для корреспонденции: Смирнова Дарья Николаевна, аспирант каф. микробиологии; e-mail: cards1993@mail.ru

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 17.05.2021

Принята к печати 23.06.2021

Опубликовано 28.01.2022

Smirnova D.N.¹, Bogacheva N.V.^{1,2}, Petrov S.B.², Tuneva N.A.²

COMPARATIVE ASSESSMENT OF THE RESULTS OF DETECTION OF CAGA-POSITIVE STRAINS OF *HELICOBACTER PYLORI* BY MOLECULAR-GENETIC AND IMMUNOCHROMATOGRAPHIC METHODS IN DIFFERENT BIOLOGICAL MATERIALS

¹Vyatka State University, 610000, Kirov, Russia;

²Kirov State Medical University, 610998, Kirov, Russia

A comparative analysis of the detection of CagA-positive strains of *H. pylori* by immunochromatographic and molecular genetic methods was carried out. We used *H. pylori* strains isolated from individuals with diseases of the gastrointestinal tract. The immunochromatographic method was implemented using a developed experimental model of an immunochromatographic test system for detecting the *H. pylori* CagA protein in various biological materials. Determination of the pathogenicity gene cagA of *H. pylori* was carried out using the «Helikopol SA» test system («Litekh», Russia). The assessment of the comparability of the results of detecting CagA-positive strains of *H. pylori* was carried out using statistical methods: Monte-Carlo, calculation of the chi-square test (χ^2) and Kendall's τ -b and Somer's d coefficients. Statistical analysis was performed using the software packages «Microsoft Office Excel», «Statistica 10.0», «WinBUGS 1.4.0.» The study showed the absence of a statistically significant difference and the presence of a direct strong correlation between the results of detecting CagA-positive strains by molecular genetic and immunochromatographic methods, which indicates that these methods provide similar results in identifying highly pathogenic strains of *H. pylori*.

Key words: *Helicobacter pylori*; immunochromatographic test system; PCR analysis; helicobacteriosis; statistical analysis.

For citation: Smirnova D.N., Bogacheva N.V., Petrov S.B., Tuneva N.A. Comparative assessment of the results of detection of CagA-positive strains of *Helicobacter pylori* by molecular-genetic and immunochromatographic methods in different biological materials. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (1): 48-52 (in Russ.). DOI: <https://dx.doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-1-48-52>

For correspondence: Smirnova D.N., postgraduate student of the Department of Microbiology; e-mail: cards1993@mail.ru

Information about authors:

Smirnova D.N., <https://orcid.org/0000-0002-0090-1891>;

Bogacheva N.V., <https://orcid.org/0000-0002-7021-6232>;

Petrov S.B., <https://orcid.org/0000-0002-2592-4432>;

Tuneva N.A., <https://orcid.org/0000-0002-7021-6232>.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 17.05.2021
Accepted 23.06.2021
Published 28.01.2022

Введение. Хеликобактериоз является одной из наиболее распространённых инфекций в мире. По данным литературы, от 60% до 90% населения во всем мире инфицированы этим микроорганизмом [1].

К числу заболеваний, этиологическим агентом которых являются *H. pylori*, относятся хронический гастрит, язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки и желудка, MALT-лимфома, рак желудка [2].

Диагностика хеликобактериоза базируется на широком спектре методов, к числу которых относятся морфологический, бактериологический, иммунологический, биохимический, молекулярно-генетический методы [3]. Разнообразен материал, подлежащий анализу на *H. pylori* – биоптаты слизистой оболочки желудка, желудочная слизь, выдыхаемый воздух, слюна, кровь, кал [4].

Появляются новые методы диагностики хеликобактериоза. Одним из них является иммунохроматографический (ИХ) анализ, позволяющий не только определить наличие инфекционного агента в пробе, но и провести дифференциацию штаммов по патогенности – определить наличие специфического антигена. Наиболее выраженные патологические процессы, связанные с повышенным риском опухолевой трансформации, вызывают штаммы *H. pylori*, вырабатывающие цитотоксин CagA. Данный цитоксин приводит к нарушению целостности эпителия слизистой оболочки желудка, к индукции неконтролируемой пролиферации лимфоидных и эпителиальных клеток и стимуляции секреции противовоспалительных цитокинов [5]. Определение факта инфицированности пациента таким штаммом позволяет назначить антибактериальную терапию и предотвратить развитие осложнений, к числу которых относится рак желудка.

Провести дифференциальную диагностику штаммов *H. pylori* по патогенности возможно молекулярно-генетическим методом с использованием ПЦР, выявив ген *cagA*, и ИХ методом, выявив белок CagA. На российском рынке отсутствуют подобные ИХ тест-системы.

Данную проблему мы решили, разработав экспериментальный образец ИХ тест-системы для выявления белка патогенности CagA *H. pylori* [6,7].

Цель исследования – провести анализ сопоставимости результатов выявления CagA-положительных штаммов *H. pylori* молекулярно-генетическим методом и с помощью разработанного экспериментального образца ИХ тест-системы.

Материал и методы. Работа выполнена на базе кафедры микробиологии Вятского государственного университета» (г. Киров).

Для исследования использовали культуры *H. pylori*, выделенные из биоптатов слизистой оболочки желудка, материала зубодесневых карманов и кала добровольцев с заболеваниями желудочно-кишечного тракта.

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.).

Взятие биологического материала из зубодесневых карманов добровольцев осуществляли с помощью стерильных зубочисток с ватными концами. Перед забором материала каждый доброволец полоскал полость рта раствором фурацилина. Материал отбирали из зубодесневых карманов маляров и резцов, затем его ресуспендировали в 1,0 мл 0,9 % растворе хлорида натрия.

Биопсийный материал слизистой желудка помещали в предварительно пронумерованные пробирки типа эппендорф с транспортной средой («БиолоТ», Россия) и доставляли в лабораторию. Перед посевом материал 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.

Биологический материал, подготовленный вышеописанным образом, по 0,1 мл засеивали на селективную питательную среду – колумбийский кровяной агар с 5% эритроцитами барана («ЭкоЛаб», Россия), амфотерицином и ванкомицином Б с целью получения чистых культур *H. pylori*. Чашки Петри с засеянным материалом инкубировали в анаэробном состоянии с газогенераторными пакетами «GAS PAK 150» («Becton Dickinson», США) для обеспечения микроаэрофильных условий (5,0% O₂, 5,0-10,0% CO₂, 85,0-90,0% N₂) при температуре 37° С в течение 3 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 гляцевую плёнку [8].

Принадлежность культур к *H. pylori* подтверждали бактериологическим, биохимическим, молекулярно-генетическим методами.

Микроскопию мазков, окрашенных по Граму, осуществляли на микроскопе «Микмед» (Россия). Для биохимической идентификации использовали уреазный, оксидазный «Oxi-тест» («Erba LACHEMA», Чехия) и каталазный тесты. Для молекулярно-генетической идентификации штаммов – комплект реагентов для ПЦР-амплификации ДНК *H. pylori* в режиме реального времени («ДНК-технологии», Россия). Определение генов патогенности *H. pylori* осуществляли методом ПЦР с использованием коммерческих тест-систем «Хеликопол СА» (на наличие гена *cagA*) («Литех», Россия).

ИХ идентификацию выделенных штаммов осуществляли с использованием коммерческих ИХ тест-систем «РЭД *Helicobacter pylori*» (Россия), «NovaMed» (Израиль), и с помощью разработанного экспериментального образца ИХ тест-системы для выявления белка CagA *H. pylori* [6, 7].

Перед тестированием культуру смывали с питательной среды, определяли общую концентрацию вырос-

шей культуры при помощи стандарта мутности ФГБУ «НЦЭСМП» Минздрава РФ (ОСО 42-28-85П), после чего доводили до концентрации $1,0 \cdot 10^{10}$ м.к.·см⁻³, используя буфер разгона (0,01 М Трис-буфере с 0,1% Tween 20, рН 7,5).

Использовано оборудование: центрифуга лабораторная «Avanti J-E» («Beckman Coulter», США); центрифуга-вортекс «Микроспин» («Biosan», Латвия); весы электронные аналитические «Adventurer» («ОНАУС», США); ламинарный шкаф II класса биологической защиты «БАВп-01» («Lamsystems», Германия); термостат «ТСО-1/80 СПУ» (Россия); термостат твердотельный программируемый «Гном ГТ-1» («ДНК-технологии», Россия); амплификатор для проведения ПЦР-анализа 4-х канальный П4-ПЦР-01 «Терцик» («ДНК-технологии», Россия); камера для электрофореза горизонтальная «Mini-Sub Gell GT» («BioRad», США); амплификатор для Real-time ПЦР «ДТ-322» («ДНК-технологии», Россия); трансиллюминатор «ЕСХ-15 М» («Vilber Lourmat», Франция).

Статистическая обработка полученных данных включала описание и анализ учетных признаков. Качественные учетные данные представлены в виде абсолютных (N) и относительных величин (P, %). Оценка статистической значимости различий между результатами выявления CagA-положительных штаммов *H. pylori* молекулярно-генетическим и ИХ методом выполнена с помощью критерия хи-квадрат (χ^2) с поправкой на непрерывность Йетса [9]. В случаях ограничения применения критерия χ^2 использовался точный критерий Фишера [10]. Критическим уровнем статистической значимости различий (*p*) установлено значение $p < 0,05$. Верификация статистической значимости различий выборочных качественных данных выполнена путём сопоставления их 95% доверительных интервалов. Расчет 95% доверительных интервалов выполнен методом Монте-Карло (с помощью программы «WinBUGS 1.4.0.» [9]. Оценка корреляционной зависимости (плотности связи) выборочных качественных данных выполнена с помощью критерия τ -b Кендалла и критерия d Сомера [10]. Стати-

стический анализ выполнен с применением программных пакетов «Microsoft Office Excel», «Statistica 10.0» и «WinBUGS 1.4.0.».

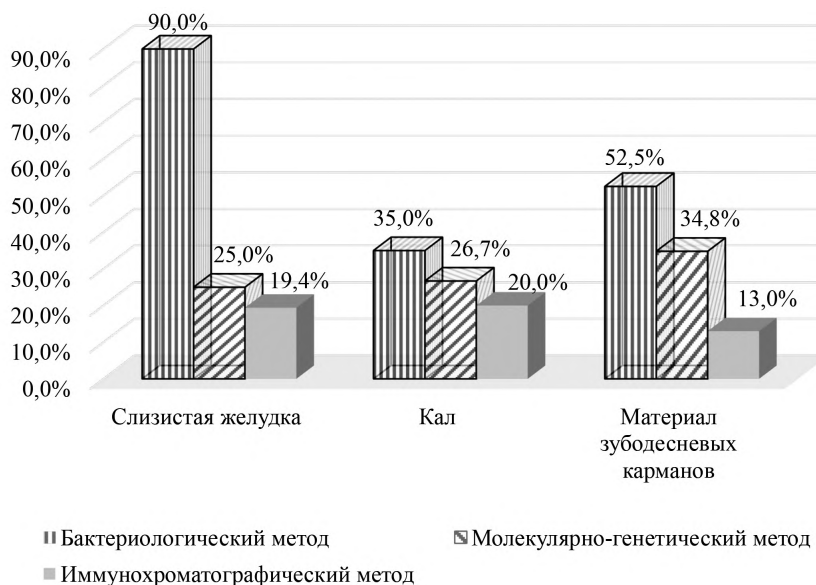
Результаты и обсуждение. На первом этапе, с целью отбора серопозитивных добровольцев провели тестирование сывороток крови на наличие антител к белку CagA *H. pylori* с помощью коммерческого набора для ДЮТ-анализа «Хелико-экспресс» («ВЕКТОР-БЕСТ», Россия).

По результатам скрининга выбрали 50 серопозитивных лиц, у которых выявлены антитела к белку CagA *H. pylori*. Данным добровольцам предложено пройти фиброгастроскопию для проведения биопсии слизистой желудка в клиниках г. Кирова. У них на исследование взяты кал и материал из зубодесневых карманов. Отобранный биологический материал доставляли в лабораторию и высевали на селективную питательную среду – колумбийский кровяной агар с антибиотиками с целью выделения чистой культуры.

На втором этапе провели бактериологическое исследование культур, выделенных из биопсийного материала слизистой желудка, кала, материала зубодесневых карманов пациентов, на принадлежность их к *H. pylori*. Из 50 серопозитивных добровольцев отобрали 40 человек, у которых чистая культура *H. pylori* выделена из всех видов биологического материала. В исследовании приняли участие 23 женщины и 17 мужчин, средний возраст добровольцев составил 40 ± 5 лет.

На следующем этапе работы культуры, выделенные из трех видов биологического материала, тестировали молекулярно-генетическим методом с помощью тест-системы «Хеликопол СА» на наличие гена *cagA* и ИХ методом с использованием разработанного экспериментального образца тест-системы на наличие белка CagA *H. pylori*.

Сравнительный анализ частоты выявления чистой культуры *H. pylori* бактериологическим методом, гена *cagA* молекулярно-генетическим, белка CagA ИХ методом в зависимости от вида исследуемого материала. представлен на рисунке.



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

Положительные результаты молекулярно-генетического и ИХ анализа на *CagA*⁺ штаммы

Молекулярно-генетический анализ		ИХ анализ		χ^2	<i>p</i> *
<i>n</i>	<i>P</i> , %	<i>n</i>	<i>P</i> , %		
9	25,0	7	19,4	0,08	0,78

Примечание. *n* – количество выделенных *CagA*⁺ штаммов; *P* – частота встречаемости положительных результатов выявления *CagA*⁺ штаммов; χ^2 – критерий хи-квадрат Пирсона. Здесь и в табл.2: *p* – уровень статистической значимости между результатами выявления *CagA*⁺ штаммов *H. pylori* молекулярно-генетическим и ИХ методами; *p** – критическим уровнем статистической значимости различий установлено значение *p*<0,05.

95% доверительные интервалы частот положительных результатов анализа на выявление *CagA*⁺ штаммов

Молекулярно-генетический анализ	ИХ анализ	<i>p</i> *
<i>P</i> , % (CI95%)	<i>P</i> , % (CI95%)	
13,88-41,23	9,91-35,09	>0,05

Примечание. CI95% – 95% доверительный интервал.

Связь между результатами выявления *CagA*⁺ штаммов, полученными молекулярно-генетическим и ИХ методами

Статистический критерий	Оценка плотности связи между результатами выявления <i>CagA</i> ⁺ штаммов при использовании	
	Молекулярно-генетического анализа	ИХ 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.

Установлено, что *H. pylori* выявлен у серопозитивных добровольцев, не принимавших ранее 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; молекулярно-генетическим – в 25,0%, в 26,7% и в 34,8% случаев, соответственно.

Методом ИХ анализа выявили, что белок *CagA* *H. pylori* выявлен в биологическом материале 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 табл. 1 представлена частота положительных результатов взаимосвязи между молекулярно-генетическим и ИХ методами по выявлению *CagA*⁺ штаммов в материале, выделенном из слизистой оболочки желудка.

Из данных табл. 1 следует, что между результатами выявления *CagA*⁺ штаммов молекулярно-генетическим и ИХ методом в исследуемой выборке отсутствуют статистически значимые различия.

Результат оценки статистической значимости различия между данными молекулярно-генетического и ИХ анализа верифицируется сопоставлением 95% доверительных интервалов частот положительных случаев выявления *CagA*⁺ штаммов с помощью обоих методов (табл. 2).

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

Количественная оценка плотности связи между результатами выявления *CagA*⁺ штаммов методами молекулярно-генетического и ИХ анализа представлена в табл. 3.

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 ИХ анализ, существует прямая, сильная связь (корреляционная зависимость). По результатам молекулярно-генетического анализа можно с высокой долей вероятности прогнозировать результат, полученный с помощью ИХ анализа, и наоборот.

Заключение. Отсутствие статистически значимого различия и наличие прямой сильной корреляционной связи между данными молекулярно-генетического и ИХ анализа, свидетельствуют о том, что эти методы позволяют получить близкие по значимости результаты выявления *CagA*⁺ штаммов *H. pylori*, а ИХ метод анализа может быть использован для выявления высокопатогенных штаммов данного микроорганизма, секретирующих белок *CagA*.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лазебник Л.Б., Васильев Ю.В., Щербаков П.Л., Хомерики С.Г., Машарова А.А., Бордин Д.С. и др. *Helicobacter pylori*: распространенность, диагностика, лечение. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2010; 2: 3-7.
2. Шкитин В.А., Шпирна А.И. Роль *Helicobacter pylori* в патологии человека. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2002; 4 (2): 128-45.
3. Хомерики С.Г., Касьяненко В.И. Лабораторная диагностика инфекции *Helicobacter pylori*. СПб: АМА; 2011.
4. Исаков В.А., Лапина Т.Л., Щербаков П.Л., Кудрявцева Л.В. Рекомендации по диагностике *Helicobacter pylori* у больных язвенной болезнью и методам их лечения. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 1998; 1: 105-7.

IMMUNOLOGY

5. Климович А.В. Создание иммунохимических реагентов для выявления CagA-антигена *Helicobacter pylori* и антител против него. Дис. ... канд. биол. наук. Санкт-Петербург; 2010.
6. Смирнова Д.Н., Богачева Н.В., Дармов И.В. Разработка экспериментального образца иммунохроматографической тест-системы для выявления белка патогенности CagA *Helicobacter pylori*. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2018; 63 (4): 242-6.
7. Богачева Н.В., Дармов И.В., Смирнова Д.Н. Иммунохроматографическая тест-система для выявления патогенных штаммов *Helicobacter pylori*. Патент РФ № 2642588; 2018.
8. Андрюков Б.Г., Лукьянчук А.Ф., Сурина О.О., Пекарская В.М. Современные методы лабораторной диагностики *H. pylori*. *Здоровье. Медицинская экология. Наука*. 2014; 1:37-43.
9. Халафян А.А. Современные статистические методы медицинских исследований. М.: Издательство ЛКИ; 2008.
10. Гланц С. Медико-биологическая статистика. М.: Практика; 1999.
3. Khomeriki S.G., Kas'yanenko V.I. Laboratory diagnostics of *Helicobacter pylori* infection. St. Petersburg: AMA; 2011. (in Russian)
4. Isakov V.A., Lapina T.L., Shcherbakov P.L., Kudryavtseva L.V. Recommendations for the diagnosis of *Helicobacter pylori* in patients with peptic ulcer disease and methods of their treatment. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 1998; 1: 105-7. (in Russian)
5. Klimovich A.V. Creation of immunochemical reagents for the detection of *Helicobacter pylori* CagA antigen and antibodies against it. Diss. St.Petersburg; 2010. (in Russian)
6. Smirnova D.N., Bogacheva N.V., Darmov I.V. Development of an experimental sample of an immunochromatographic test system for detecting the pathogenicity protein CagA *Helicobacter pylori*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2018; 63 (4): 242-6. (in Russian)
7. Bogacheva N.V., Darmov I.V., Smirnova D.N. Immunochromatographic test system for the detection of pathogenic strains of *Helicobacter pylori*. Патент РФ № 2642588; 2018. (in Russian)
8. Andryukov B.G., Luk'yanchuk A.F., Surina O.O., Pekarskaya V.M. Modern methods of laboratory diagnosis of *H. pylori*. *Zdorov'e. Meditsinskaya ekologiya. Nauka*. 2014; 1: 37-43.
9. Khalafyan A.A. Modern statistical methods of medical research. Moscow: Izdatel'stvo LKI; 2008. (in Russian)
10. Glants S. Biomedical statistics. Moscow: Praktika; 1999. (in Russian)

REFERENCES

1. Lazebnik L.B., Vasil'ev Yu.V., Shcherbakov P.L., Homeriki S.G., Masharova A.A., Bordin D.S. et al. *Helicobacter pylori*: prevalence, diagnosis, treatment. *Eksperimental'naya i klinicheskaya gastroenterologiya*. 2010; 2: 3-7. (in Russian)
2. Shkitin V.A., Shpirna A.I. The role of *Helicobacter pylori* in human pathology. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2002; 4 (2): 128-45. (in Russian)