

ИММУНОЛОГИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2024

Акиншина Ю.А.¹, Марданлы С.Г.^{1,2}, Ротанов С.В.^{1,3}, Ханина М.А.²

ОБ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОМ ВЫЯВЛЕНИИ *HELICOBACTER PYLORI* У ЧЕЛОВЕКА

¹АО «ЭКОлаб», 142530, г. Электрогорск, Россия;

²ГОУВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет» (ГОУ ВО МО «ГГТУ»), 142611, г. Орехово-Зуево, Россия;

³ФБУН «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора), 142279, г.о. Серпухов, п. Оболensk, Россия

Представлены результаты разработки и апробации набора реагентов «Тест-система иммунохроматографическая для качественного выявления Helicobacter pylori в образцах кала человека «ИХА-Хелико-антиген». Установлена высокая диагностическая эффективность применения разработанной тест-системы.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*; клиническая микробиология; иммунохроматография; образцы кала

Для цитирования: Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В., Ханина М.А. Об иммунохроматографическом выявлении *Helicobacter pylori* у человека. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (4): 123-130.

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-4-123-130>

Для корреспонденции: Акиншина Юлия Александровна, канд. биол. наук, руководитель научно-производственного отдела ИХТС АО «ЭКОлаб»; e-mail: akinshina.opr@mail.ru

Финансирование. *Исследование не имело спонсорской поддержки.*

Конфликт интересов. *Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

Поступила 04.03.2024

Принята к печати 12.03.2024

Опубликовано 26.03.2024

Akinshina Yu.A.¹, Mardanly S.G.^{1,2}, Rotanov S.V.¹, Khanina M.A.²

ON IMMUNOCHROMATOGRAPHIC DETECTION OF *HELICOBACTER PYLORI* IN HUMANS

¹JSC «EKOlab», 142530, Elektrogorsk, Russia;

²State educational institution of higher education of the Moscow region «State Humanitarian University of Technology» (GGTU), 142611, Orekhovo-Zuyevo, Russia;

³Federal budgetary institution of Science «State Scientific Centre of Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор (FSBI "SSC PMB" of Rosпотребнадzor), 142279, Serpukhov, Obolensk, Russia

The paper presents the results of the development and testing of the reagent kit «Immunochromatographic test system for the qualitative detection of Helicobacter pylori in human fecal samples «ИХА-Helico-antigen». The high diagnostic efficiency of the developed test system has been established.

Key words: *Helicobacter pylori*; clinical microbiology; immunochromatography; stool samples.

For citation: Akinshina Yu.A., Mardanly S.G., Rotanov S.V., Khanina M.A. On immunochromatographic detection of *Helicobacter pylori*. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2024; 69 (4): 123-130 (in Russ.).

DOI: <https://doi.org/10.51620/0869-2084-2024-69-4-123-130>

For correspondence: Akinshina Yulia Aleksandrovna, PhD in Biological specialist of the Innovative Development Department JSC «EKOlab»; e-mail: akinshina.opr@mail.ru

Information about authors:

Akinshina Yu.A., <https://orcid.org/0000-0002-9223-3455>;

Mardanly S.G., <https://orcid.org/0000-0002-4556-135X>;

Rotanov S.V., <https://orcid.org/0000-0002-3222-1401>;

Hanina M.A., <https://orcid.org/0000-0002-9705-1490>.

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

Acknowledgment. *The study had no sponsor support.*

Received 04.03.2024

Accepted 12.03.2024

Published 26.03.2024

Введение. Приоритет открытия и установления этиологической роли *Helicobacter pylori* в развитии гастрита и язвенной болезни у человека принадлежит австралийским врачам: патоморфологу Barry J. Marshall и в то же время врачу-стажеру J. Robin Warren. За результаты своих исследований, проведённых в 1979-1984 годах, они удостоены Нобелевской премии 2005 года по медицине и физиологии. Спиралевидные бактерии в слизистой оболочке желудка человека и животных неоднократно выявляли исследователи разных стран и раньше, начиная с середины XIX века. Заслуга австралийских учёных состояла в разработке условий культивирования этой бактерии на селективной плотной питательной среде, изучении её свойств, определении частоты выявления *H. pylori* у больных гастритом (65%), язвенной болезнью желудка (до 80%) и двенадцатиперстной кишки (до 90%), что позволило установить и экспериментально доказать этиологическую роль этого патогена в развитии у человека перечисленных нозологических форм, в разработке метода терапии этой инфекции человека солями висмута в сочетании с метронидазолом [1-3].

Позднее установлена высокая корреляционная зависимость инфицирования *H. pylori* по отношению к последующему развитию аденокарциномы и MALT-лимфомы желудка. Не исключено участие бактерий в патогенезе железодефицитной анемии, идиопатической тромбоцитопенической пурпуры, дефицита витамина B₁₂ [4-6].

По данным медицинской статистики инфекция *H. pylori* является одной из наиболее распространённых в мире бактериальных инфекций человека. В России уровень распространения патогена среди взрослого населения составляет 65-92% [4, 7]. Заражение происходит от больного хеликобактериозом или носителя в раннем возрасте. Пути передачи: фекально-оральный и ятрогенный (через медицинские инструменты при гастроскопии или стоматологических процедурах). Инфекция длительное время может протекать бессимптомно или быстро приводить к диспепсическим нарушениям различной выраженности.

По современным представлениям *H. pylori* является грамотрицательной неспорообразующей микроаэрофильной бактерией извитой формы; на одном её полюсе имеется 2-6 жгутиков, с помощью которых возможно быстрое перемещение даже в густой слизистой среде. Активные формы существования *H. pylori* напоминают букву «S» или спираль с 1-3 завитками и 5-7 жгутиками; при неблагоприятных условиях возможна обратимая трансформация бактерии в дормантные («С»- или «U»-) или даже кокковидные формы с утратой жгутиков [2-4].

При инфицировании *H. pylori* колонизирует слизистую оболочку пилорического отдела желудка и двенадцатиперстной кишки. Различные штаммы *H. pylori* отличаются разной патогенностью и адаптацией к жизни в кислой среде. Патоген обладает выраженной ферментативной активностью. Метаболизм *H. pylori* обеспечивается энергией расщепления трикарбонных кислот и аминокислот, но не углеводов.

В желудке человека *H. pylori* внедряется в слизистую оболочку и начинает синтезировать активные вещества, в частности, фермент уреазу, расщепляющую мочевины пищевого комка с образованием аммиака, ко-

торый, в свою очередь, частично нейтрализует соляную кислоту желудочного сока и создаёт комфортную для *H. pylori* щелочную среду. Продуцируемые *H. pylori* аммиак, цитотоксины и муколитические ферменты (протеаза и липаза) могут разрушать слизистый барьер стенок желудка и приводить к образованию изъязвлений.

В процессе жизнедеятельности *H. pylori* стимулирует развитие адаптивного иммунитета организма, что сопровождается выработкой защитных антител разных классов. Если факторы иммунной системы не обеспечивают полной элиминации *H. pylori*, воспалительный процесс становится хроническим. Механизмы иммунной защиты в определённой степени поддерживают повреждение слизистой оболочки и развитие гастрита и язвы.

В соответствии с действующими международными и национальными клиническими рекомендациями [7-15] утверждены современные методы исследования для выявления *H. pylori* и изучения свойств выделенных штаммов патогена.

К методам с неинвазивным подтверждением диагноза у человека и получением биоматериала для исследования относятся:

дыхательный тест с мочевиной, меченой ¹³C (эталон, как для первичной диагностики, так и для контроля успешности эрадикации) или ¹⁵C;

определение антигена *H. pylori* в кале;

выявление *H. pylori* в кале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).

В группу малотравматичных инвазивных методов следует отнести определение в сыворотке крови антител (иммуноглобулинов различных классов, Ig) к *H. pylori* (серологические или иммунохимические тесты).

Инвазивными являются методы выявления *H. pylori* в биоптатах слизистой оболочки желудка, полученных при эзофагогастродуоденоскопии:

быстрый уреазный тест с биоптатом,

гистологическое исследование,

ПЦР с биоптатом.

Разработаны условия и селективные плотные питательные среды для бактериологических исследований *H. pylori* (выделенного из кала или биоптата) с определением чувствительности клинических изолятов к антимикробным препаратам (АМП).

Доступным неинвазивным методом обследования пациента является определение антигена *H. pylori* в кале, чему и посвящено это исследование.

Цель работы: разработка иммунохроматографического набора реагентов для одноэтапного качественного выявления *Helicobacter pylori* в образцах кала человека, выпуск экспериментально-производственных серий нового набора для изучения его клинико-диагностических показателей.

Материал и методы. При разработке дизайна исследования в основу положена технология конструирования иммунохроматографической кассеты, содержащей мультимембранную тест-полоску с нанесёнными на её поверхность необходимыми компонентами [16-21].

Основу реакционной тест-полоски составили: нитроцеллюлозная мембрана для производства иммунохроматографических наборов размером 30x4 мм, толщиной 185 мкм ± 20% («Millipore», США); впитывающая мембрана для нанесения образца, размером

20x4 мм и толщиной 0,6-0,8 мм, плотностью 270±20 г/м² («MDI», Индия); мембрана для адсорбции, размером 16x4 мм и толщиной 0,2-0,5 мм, плотностью 179±5 г/м², тип AP110 («MDI», Индия); мембрана для нанесения конъюгата размером 6x4 мм («Millipore», США.). При получении конъюгатов кроличьих IgG, антител к *Helicobacter pylori* использована золотохлористоводородная кислота (ЗХВК) цитрат натрия фирмы «Sigma Aldrich» (США).

Размеры и однородность наночастиц коллоидного золота (НЧ-КЗ) определены с помощью просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) и спектрофотометрически.

При конструировании активизированной мелкопористой мембраны (тест-полоски) в соответствии с технологией применены моноклональные антитела к антигенам *H. pylori* (тестовая линия) в концентрации ≥0,5 мг/мл в фосфатном буфере и pH 7,4 (ООО «Хайтест», Москва) и козы антитела к IgG мыши (контрольная линия) в концентрации ≥1 мг/мл в трисовом буфере и pH 7,4 («Имтек», Москва), конъюгаты кроличьих антител к антигенам *H. pylori* в концентрации ≥1 мг/мл, в фосфатном буфере (pH 7,4) («Medix Biochemica», Финляндия) и мышинные иммуноглобулины класса IgG в концентрации ≥0,5 мг/мл в фосфатном буфере (pH 7,4) (ООО «Биосан», Новосибирск) с коллоидными частицами золота (размер частиц 30-80 нм).

Для приготовления необходимых растворов применена только деионизованная вода с удельным сопротивлением не менее 18,2 Мом/см при 25 °С («Simplicity System», фирмы «Millipore», США). При необходимости очищенную воду дополнительно фильтровали через пакет стерилизующих фильтров с размерами пор 0,45-0,22 мкм фирмы «Millipore» (США).

В качестве контрольного материала для оценки параметров диагностической эффективности компонентов разработанного теста применены стандартные образцы предприятия (СОП-275), изготовленные на основе биологических образцов (образцов кала), содержащих и не содержащих *H. pylori*.

Для проведения клинических испытаний по оценке диагностической информативности разработанного набора реагентов использованы образцы кала, содержащие ($n=124$) и не содержащие ($n=145$) *H. pylori*, полученные от больных и здоровых лиц из МУЗ «Павлово-Посадская ЦРБ» (лицензия на осуществление медицинской деятельности № ЛО-50-01-004916 от 18.12.2013 г.), ГБУЗ МО Электрогорская городская больница (лицензия № ЛО-50-01-006444 от 19.02.2015 г.), Диагностический Центр «El'Clinic» АО «ЭКОлаб» (лицензия № ЛО-50-01-006551 от 08.04.2015 г.).

С целью изучения факторов потенциальной интерференции и выявления перекрёстных реакций в иммунохроматографических исследованиях дополнительно собраны образцы кала, как содержащие, так и не содержащие *H. pylori*, с учётом следующих показателей: повышенное содержание билирубина (соответственно $n=24$ и $n=35$), аскорбиновой кислоты (соответственно $n=25$ и $n=32$) или триглицеридов (соответственно $n=26$ и $n=32$).

Пациенты клинических учреждений имели диа-

гнозы в соответствии с классификатором заболеваний и патологических состояний: В98.0 - *H. pylori* в качестве причины болезней, классифицированных в других рубриках; К27.7 - хроническая пептическая язва без кровотечения или прободения; К29.1 - другие острые гастриты; К29.3 - хронический поверхностный гастрит; К29.4 - хронический атрофический гастрит; К30 - функциональная диспепсия.

В качестве референс-системы использован «Тест иммуно-хроматографический для выявления антигенов *Helicobacter pylori* в кале «РЭД», выпуска ООО «РЭД» (Москва), РУ № ФСР 2012/13624 от 29.06.2012, серии 210376-01 от 02. 2019.

Результаты. Получение конъюгатов для ИХА. Из золотохлористоводородной кислоты (ЗХВК) по методу Френса синтезировали наночастицы коллоидного золота (НЧ-КЗ) со средним размером частиц 30 нм; полученный продукт НЧ-КЗ (30 нм) имел спектр поглощения света с максимумом при длине волны 524-525 нм.

На основе полученных частиц НЧ-КЗ опытно-экспериментальным путём готовили: конъюгат НЧ-КЗ с антителами к IgG кролика и конъюгат НЧ-КЗ со специфическими моноклональными мышинными антителами к *H. pylori*. При этом выбор количественных соотношений используемых реагентов для оптимальной конъюгации осуществлён на основании построения и последующего анализа флоккуляционных кривых, отражающих агрегацию продукта реакции при высокой ионной силе раствора. При проведении серии исследований показано, что для обоих видов антител минимальная их концентрация, обеспечивающая устойчивость золя к коагулирующему действию электролита, составила 10-15 мкг/мл. На этом основании для получения обоих типов конъюгатов с НЧ-КЗ выбрана концентрация обоих видов антител 15 мкг/мл, как наиболее эффективная.

Реакционную смесь инкубировали при температуре 20-22 °С и постоянном перемешивании в течение 30 минут. Для завершения процесса конъюгации после указанной экспозиции вносили 10% водный раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) до конечной его концентрации 0,25%. 10% раствор БСА перед применением подвергали стерилизующей фильтрации через набор фильтров с размером пор 0,45-0,2 мкм.

Полученные конъюгаты (НЧ-КЗ с иммобилизованными на них антителами) отделяли от непрореагировавших солюбилизованных антител путём центрифугирования при 10 тыс. g в течение 30 минут. После удаления супернатанта осадок конъюгатов ресуспендировали в 10 мМ трис-НСI буфера, содержащем БСА, сахарозу и азид натрия. Полученные препараты конъюгатов антител и НЧ-КЗ хранили при 4-6 °С.

Подготовка мембран. Подготовка мембраны для образца. Готовили буферный раствор, содержащий трис-оксиметил аминотетран (1%), трис оксиметил аминотетран гидрохлорид (0,1%), казеинат натрияевую соль (1%), поливинилпирролидон (0,1%), азид натрия (0,02%), твин-20 (0,01%); при pH=8,0. Мембрану для образца пропитывали данным раствором в объёме 50 мл на лист 20,4x25,4 см при инкубации на орбитальном шейкере в течение 15 мин с каждой стороны.

Мембраны для образца высушивали при комнатной температуре (18-25 °С) и относительной влажности не более 30% в течение 24 часов; подготовленные мембраны хранили при комнатной температуре (18-25 °С) и относительной влажности не более 30%. Нарезку проводили на автоматическом резаке на полоски длиной по 1,9 см.

Подготовка мембраны для конъюгата. Готовили буферный раствор, содержащий натрий гидрофосфат безводный (1,5%), поливиниловый спирт (0,5%), альбумин бычий сывороточный (1%), тритон-X-100 (0,1%), азид натрия (0,2%), при pH=7,4. Мембрану для конъюгата пропитывали в объёме 20 мл на лист 20,4x25,4 см, выдерживая на орбитальном шейкере в течение 15 мин с каждой стороны. Сушку мембран для образца осуществляли при комнатной температуре (18-25 °С) и относительной влажности не более 30% в течение 24 часов. Высушенные мембраны хранили при комнатной температуре (18-25 °С) и относительной влажности не более 30%. Нарезку проводили на автоматическом резаке по 0,9 см.

Подготовка мембраны для адсорбции. Мембраны для адсорбции не требовали обработки, их нарезали на автоматическом резаке по 1,5 см.

Сорбция антител. Сорбцию проводили с помощью диспенсера «АУТОКУН», HGS510. На подложку без защитного слоя наклеивали нитроцеллюлозную мембрану CN140. На каждую подложку наносили рабочий раствор антител для тестовой и контрольной линии в объёме 2 мкл на см. Сушку подложки с нанесёнными антителами осуществляли при комнатной температуре (18-25 °С) и относительной

влажности не более 30% в течение 24 часов. Высушенные подложки хранили при комнатной температуре (18-25 °С) и относительной влажности не более 30% в бумажном конверте.

Приготовление рабочего разведения конъюгата. Готовили буферный раствор, содержащий трис-оксиметил-аминометан гидрохлорид (10,1%), трис-оксиметил-аминометан (3,2%), БСА (1%), азид (0,02%), при pH=8,0. Хранили раствор для сорбции при температуре 2-8 °С в течение 14 суток. Перед разведением конъюгата в раствор добавляли сахарозу 20% и трегалозу 5%. Определяли рабочее разведение конъюгата; в качестве рабочего значения принимали то, при котором достигаются устойчивые результаты с СОП для данного теста.

Сорбция конъюгата. Обработанные листы мембран выкладывали в чистый и сухой лоток под размер листа, обрабатывали раствором конъюгата из расчёта 20 мкл на см². Сушку листов с нанесённым конъюгатом осуществляли при комнатной температуре (18-25 °С) и относительной влажности не более 30% в течение 24 часов. Высушенные мембраны с нанесённым конъюгатом хранили при комнатной температуре (18-25 °С) и относительной влажности не более 30% в бумажном конверте. Нарезку осуществляли в автоматическом резаке по 0,9 см. Хранили при комнатной температуре (18-25 °С) и относительной влажности не более 30% в бумажном конверте.

Сборка и нарезка иммуносорбента (мастершита). Сборку мастершита осуществляли при комнатной температуре (18-25 °С) и относительной влажности не более 30% (рис. 1).



Рис. 1. Схема сборки мастершита и схема исследования.

Собранный мастершит нарезают в поперечном направлении на тест-полоски шириной по 4 мм на высокоскоростном резке HGS210, «АУТОКУН».

На предприятии АО «ЭКОлаб» разработана конструкция специфически сенсibilизированной иммунохроматографической тест-полоски, которую для удобства последующего применения заключают в пластиковую кассету. Набор необходимых компонентов для проведения лабораторных иммунохроматографических исследований по выявлению антигенов *H. pylori* назван «ИХА-Хелико-антиген». Маркетологами учреждения обосновано решение о его производственном выпуске в двух вариантах: комплектация № 1 в составе 10 тест-кассет, 10 флаконов-капельниц с готовым буферным раствором для разведения исследуемого образца кала и Инструкции по применению набора и комплектация № 2, отличающаяся тем, что в наборе содержится 25 тест-кассет и 25 флаконов-капельниц.

Принцип работы разработанного теста «ИХА-Хелико-антиген». В основу разработанного теста, реализованного в формате набора реагентов «ИХА-Хелико-антиген», положена технология качественного иммунохроматографического определения антигена - *H. pylori*.

При наличии в исследуемой пробе антигенов *H. pylori* они связываются в области внесения пробы на мембране со специфичным конъюгатом, представляющим собой моноклональные антитела к антигенам *H. pylori*, меченные коллоидным золотом (НЧ-КЗ). В результате взаимодействия формируется комплекс «антиген исследуемой пробы + антитело конъюгата», который мигрирует с током жидкости вдоль мембраны.

В тестовой зоне (Т) мембраны происходит взаимодействие этого комплекса с иммобилизованными на указанном участке моноклональными антителами к антигенам *H. pylori* с образованием окрашенного иммунного комплекса «антитело подложки + антиген исследуемой пробы + антитело конъюгата». Появление цветной линии в тестовой зоне указывает на положительный результат (определение в исследуемой пробе антигенов *H. pylori*), а отсутствие окрашенной линии - на отрицательный (отсутствие в исследуемой пробе антигенов *H. pylori*). Невступивший в реакцию в Т-зоне конъюгат, продвигаясь вдоль мембраны, взаимодействует с анти-видовыми антителами в области контрольной зоны (С) с образованием окрашенного иммунного комплекса. Цветная контрольная линия (С-зона) должна формироваться всегда, независимо от наличия антигенов *H. pylori* в образце, что является внутренним контролем валидации рабочей мембраны. Отсутствие окрашенной полосы в конце исследования свидетельствует о нарушении работоспособности использованной мембраны, результат определения считается недействительным, и требуется повторное исследование пробы с валидной мембраной.

Исследование проводится при комнатной температуре. Для каждого образца используется отдельная тест-кассета с мембраной.

Приготовление пробы для исследования. Для исследования необходимо получить свежий образец кала обследуемого лица, собранный в промаркированный специальный транспортный контейнер или чашку Петри, не содержащие консерванты (рис. 2).



Рис. 2. Рекомендуемый способ сбора и разведения исследуемых проб кала.

Берут одноразовый пластиковый флакон-капельницу с буферным раствором (2,0 мл) для разведения пробы кала, отвинчивают крышку, не проливая раствор из неё. С помощью аппликатора, прикрепленного изнутри на крышке флакона, из транспортного контейнера или чашки Петри получают небольшое количество кала (меньше горошины) из трёх областей кала, переносят во флакон-капельницу.

Крышку флакона завинчивают и несколько раз осторожно встряхивают, переворачивают для растворения пробы. Проба готова к исследованию. Для каждого образца кала следует использовать отдельную пробирку-капельницу.

После вскрытия неиспользованные флаконы-капельницы с БР допускается хранить при температуре от 2 до 25 °С до истечения срока годности.

До проведения исследования образцы кала можно хранить при температуре от 2 до 8 °С не более 2 суток, при необходимости более длительного хранения их замораживают при температуре –20 °С и ниже. Перед исследованием образцы кала должны быть полностью разморожены и доведены до комнатной температуры. Допускается однократное замораживание - размораживание образцов.

Порядок проведения исследования

Оборудование и материалы: таймер, медицинские перчатки, холодильник с морозильной камерой, 70% раствор спирта этилового и 6% раствор перекиси водорода (дез.раствор) или растворы иных дезинфектантов, разрешённые к применению СП 1.32322-08, кроме

хлорсодержащих; возможно использование автоматических дозаторов.

Подготовка к проведению исследования. Все компоненты набора и исследуемые образцы доводят до комнатной температуры от 18 до 25 °С; пакет с тест-кассетой выдерживают при указанной температуре до вскрытия!

Проведение исследования. Надев медицинские перчатки, осторожно извлекают тест-кассету из индивидуальной упаковки, не касаясь пальцами окна для внесения образца, маркируют её фамилией или кодовым номером пациента, и кладут устройство на ровную горизонтальную поверхность.

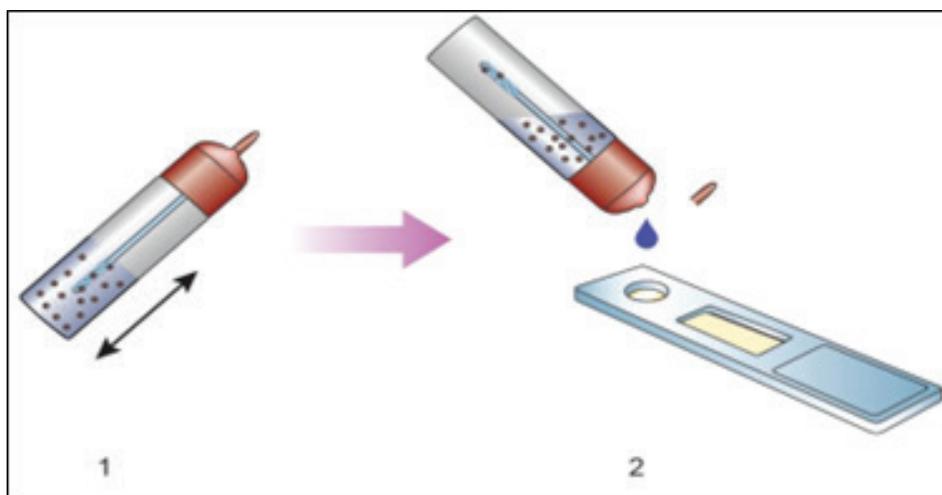


Рис. 3. Подготовка флакона-капельницы для внесения пробы на тест-кассету.

Таблица 1

Критерии интерпретации результата исследования

Отрицательный результат	Положительный результат	Недействительный результат	
В контрольной зоне (С) проявляется красная линия, в тестовой зоне (Т) окрашивания не происходит	Проявляются две четкие красные или розовые линии: одна - в контрольной зоне (С), другая - в тестовой зоне (Т)	В контрольной зоне (С) не появляется окрашенной линии независимо от наличия линий в тестовой зоне (Т)	

Встряхивают флакон-капельницу подготовленной пробой. Отламывают или отрезают кончик на крышке флакона-капельницы и вносят последовательно 3 капли (100 мкл) полученной суспензии исследуемого образца в круглое отверстие тест-кассеты (рис 3). Для каждого образца необходимо использовать отдельную тест-кассету. Запускают таймер. Через 5-10 минут (но

не позднее 15 мин после внесения проб) визуально оценивают результат исследования.

Учёт и интерпретация результатов (табл. 1). Интенсивность окраски появившихся на мембране линий может меняться в зависимости от концентрации антигенов *H. pylori* в исследуемом образце.

В случае получения недействительного результа-

та исследование следует повторить с использованием другой тест-кассеты набора.

Отрицательный результат анализа указывает на отсутствие антигенов *H. pylori* в исследуемой пробе или их наличие в концентрации ниже порога детекции. Положительный результат анализа указывает на наличие *H. pylori* в исследуемой пробе.

Избыточное количество образца кала во флаконе-капельнице может привести к появлению некорректных результатов (нечётких линий тёмного цвета). В этом случае необходимо повторно развести меньшее количе-

ство образца кала и повторить исследование с использованием другой тест-кассеты «ИХА-Хелико-антиген».

Изучение диагностических возможностей разработанного набора реагентов. Для оценки клинической информативности результатов исследований с разработанным набором реагентов проведены испытания с использованием 270 образцов кала, содержащие ($n=124$) и не содержащие ($n=146$) *H. pylori*, полученные от больных и здоровых лиц, проходивших обследование в лечебно-профилактических учреждениях. Результаты исследований представлены в табл. 2.

Таблица 2

Исследования с «ИХА-Хелико-антиген» и набором реагентов сравнения

Образцы кала	n	Результаты исследования с «ИХА-Хелико-антиген», абс.(%)				Результаты исследования с «РЭД <i>H. pylori</i> », абс.(%)	
		Комплект 1		Комплект 2		+	-
		+*	-**	+	-		
Содержащие <i>H. pylori</i> без учёта интерферирующих факторов	124	124 (100)	0 (0)	124 (100)	0 (0)	124 (100)	0 (0)
Содержащие <i>H. pylori</i> с повышенным содержанием билирубина	24	24 (100)	0 (0)	24 (100)	0 (0)	24 (100)	0 (0)
Содержащие <i>H. pylori</i> с повышенным содержанием аскорбиновой кислоты	25	25 (100)	0 (0)	25 (100)	0 (0)	25 (100)	0 (0)
Содержащие <i>H. pylori</i> с повышенным содержанием триглицеридов	26	26 (100)	0 (0)	26 (100)	0 (0)	26 (100)	0 (0)
Не содержащие <i>H. pylori</i> без учёта интерферирующих факторов	146	0 (0)	146 (100)	0 (0)	146 (100)	0 (0)	146 (100)
Не содержащие <i>H. pylori</i> , с повышенным содержанием билирубина	35	0 (0)	35 (100)	0 (0)	35 (100)	0 (0)	35 (100)
Не содержащие <i>H. pylori</i> , с повышенным содержанием аскорбиновой кислоты	32	0 (0)	32 (100)	0 (0)	32 (100)	0 (0)	32 (100)
Не содержащие <i>H. pylori</i> , с повышенным содержанием триглицеридов	32	0 (0)	32 (100)	0 (0)	32 (100)	0 (0)	32 (100)

Примечание. * - положительный результат теста; ** - отрицательный результат теста.

В результате проведённых исследований с разработанным набором реагентов по сравнению с набором реагентов сравнения показана высокая диагностическая чувствительность (100%) и специфичность (100%), установлено отсутствие влияния на результаты исследований таких интерферирующих факторов, как повышенное содержание билирубина, аскорбиновой кислоты, триглицеридов.

Клинические испытания разработанного набора реагентов позволили осуществить его регистрацию в Российской Федерации. Набор реагентов «Тест-система иммунохроматографическая для качественного выявления *Helicobacter pylori* в образцах кала человека «ИХА-Хелико-антиген» получил регистрационное удостоверение № РЗН 2019/9188 от 07.11.2019 года.

Заключение. Разработана конструкция специфически сенсibilизированной мембраны для проведения клинических лабораторных иммунохроматографических исследований с образцами кала по выявлению *H. pylori* и условия её серийного производства. Выпущены экспериментально-производственные серии медицинского изделия «Тест-система иммунохроматографическая для качественного выявления *Helicobacter pylori* в образцах кала

человека» «ИХА-Хелико-антиген» для проведения клинических испытаний с целью регистрации набора реагентов в Российской Федерации в установленном порядке. Установлены высокие показатели клинической диагностической эффективности разработанного набора реагентов «ИХА-Хелико-антиген»: клиническая чувствительность (100%) и клиническая специфичность (100%) при сравнительных испытаниях с набором реагентов сравнения, уже имеющим регистрацию в Российской Федерации. Показано отсутствие интерферирующего влияния и получения ложных положительных результатов исследований с разработанным набором реагентов по отношению к таким патологическим факторам как повышенное содержание билирубина, аскорбиновой кислоты, билирубина. Разработанный АО «ЭКОлаб» набор реагентов «Тест-система иммунохроматографическая для качественного выявления *Helicobacter pylori* в образцах кала человека «ИХА-Хелико-антиген» представлен к государственной регистрации в установленном в России порядке, и получил регистрационное удостоверение № РЗН 2019/9188 от 07.11.2019 г., что позволяет применять его в лечебно-профилактических учреждениях при оказании медицинской помощи населению.

ЛИТЕРАТУРА (П П . 2 - 6 , 9 С М REFERENCES)

- Бордин Д.С., Шенгелия М.И., Иванова В.А., Войнован И.Н. История открытия бактерии *Helicobacter pylori*. *Терапевтический архив*. 2022; 94(2): 283-8. DOI: 10.26442/00403660.2022.02.201377.
- Ивашкин В. Т., Маев И. В., Лапина Т. Л., Шептулин А.А., Трухманов А.С., Баранская Е.К. и др. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению инфекции *Helicobacter pylori* у взрослых. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2018; 28(1): 55-70.
- Мишушкин О. Н., Зверков И. В., Львова Н. В., Скибина Ю.С., Иневатова В.С. Хронический гастрит: современное состояние проблемы. *Терапевтический архив*. 2020; 92(8): 18-23.
- Katellaris P., Hunt R., Bazzoli F., Cohen H., Ming K.F., Gemilyan M. Глобальные практические рекомендации Всемирной гастроэнтерологической организации. ВОЗ; 2021.
- Козлов Р.С., Иванчик Н.В., Дехнич Н.Н. Клинические рекомендации: Выделение, идентификация и определение чувствительности *Helicobacter pylori* к антимикробным препаратам. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2014; 16(3):181-4.
- Лазебник Л.Б., Бордин Д.С., Дехнич Н.Н., Козлов Р.С., Тряпшшо А.А. VII национальные рекомендации по диагностике и лечению заболеваний, ассоциированных с *Helicobacter pylori* (VII Московские соглашения): Методические рекомендации. Российское научное медицинское общество терапевтов; Научное общество гастроэнтерологов России; 2021.
- Пиманов С.И., Макаренко Е.В. Обновленные рекомендации: Мaaстрихт VI. Флорентийского консенсуса по лечению инфекции *Helicobacter pylori*. *Consilium Medicum*. 2022; 24(12): 851-9. DOI: 10.26442/20751753.2022.12.202045.
- Исаева Г.Ш., Валиева Р.И. Биологические свойства и вирулентность *Helicobacter pylori*. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2018; 20(1): 14-23.
- Бордин Д.С., Войнован И.Н., Колбасников С.В., Эмбутниекс Ю.В. Методы диагностики инфекции *Helicobacter pylori* в клинической практике. *Терапевтический архив*. 2018; 12: 133-9.
- Акиншина Ю.А., Бикетов С.Ф., Гашенко Т.Ю., Дятлов И.А., Жигалева О.Н., Осин Н.С. и др. Исследование, разработка, производство и реализация "комплекса методических, реактивных и технических средств клинической лабораторной диагностики социально значимых инфекционных заболеваний. Электротгорск; ГГТУ; 2023:325.
- Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г. Экспресс-тест для самотестирования с целью выявления SARS-CoV-2 в слюне человека. В кн.: Научные лабораторные технологии для клинической медицины. Материалы XXVIII Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. М.: Блок-Принт; 2023: 3-4.
- Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г. Иммунохроматографический тест для полуколичественного определения простатспецифического антигена (ПСА) в сыворотке, плазме или цельной крови человека "ИХА-ПСА". *Известия ГГТУ. Медицина, фармация*. 2023; 2: 9-14.
- Серякова П.В., Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г. Разработка иммунохроматографической тест-системы для выявления сывороточных антител к *T. pallidum*. В сб.: Медицина и фармация: прошлое, настоящее, будущее: Сб. научных материалов III Всероссийской научно-практической конференции с международным участием. Орехово-Зуево: ГГТУ, АО «ЭКОлаб»; 2022: 129-31.
- Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В., Помазанов В.В., Киселева В.А. О количественном определении D-димера в крови иммунохроматографическим методом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67(2): 91-6.
- Акиншина Ю.А., Марданлы С.С., Киселева В.А. Иммунохроматографический тест для дифференцированного выявления антител классов М и G к коронавирусу SARS-CoV-2. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2020; 65(11): 688-92.
- thelium in active chronic gastritis. *Lancet*. 1983; 1(8336): 1273-5.
- Marshall B.J., Warren J.R. Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet*. 1984; 1(8390): 1311-5. DOI: 10.1016/s0140-6736(84)91816-6.
- Qu X.N., Huang X.L., Xiong P., Zhu C.Y., Huang Y.L., Lu L.G. et al. Does *Helicobacter pylori* infection play a role in iron deficiency anemia? A meta-analysis. *World J. Gastroenterol*. 2010; 16(7): 886-96.
- Arnold D.M., Bernotas A., Nazi I. et al. Platelet count response to *H. pylori* treatment in patients with immune thrombocytopenic purpura with and without *H. pylori* infection: a systematic review. *Haematologica* 2009; 94(6): 850-6.
- Vitale G., Barbaro F., Ianiro G. et al. Nutritional aspects of *Helicobacter pylori* infection. *Minerva Gastroenterol. Dietol*. 2011; 57(4): 369-77.
- Ivashkin V. T., Maev I. V., Lapina T. L., Sheptulin A.A., Trukhmanov A.S., Baranskaya E.K. et al. Clinical guidelines of the Russian Gastroenterological Association for the diagnosis and treatment of *Helicobacter pylori* infection in adults. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2018; 28(1): 55-70. (in Russian)
- Minushkin O. N., Zverkov I. V., L'vova N. V., Skibina Yu.S., Inevatova V.S. Chronic gastritis: current state of the problem. *Terapevticheskii arkhiv*. 2020; 92(8): 18-23. (in Russian)
- Parikh N.S., Ahlawat R. *Helicobacter pylori*. StatPearls. N.S. Parikh, R. Ahlawat *Helicobacter pylori* [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK534233/].
- Katellaris P., Hunt R., Bazzoli F., Cohen H., Ming K.F., Gemilyan M. Global practice guidelines from the World Gastroenterology Organization; 2021. (in Russian)
- Kozlov R.S., Ivanchik N.V., Dekhnich N.N. Clinical guidelines: Isolation, identification and determination of the sensitivity of *Helicobacter pylori* to antimicrobial drugs. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2014; 16(3):181-4. (in Russian)
- Lazebnik L.B., Bordin D.S., Dekhnich N.N., Kozlov R.S., Tryapyshe A.A. VII national recommendations for the diagnosis and treatment of diseases associated with *Helicobacter pylori* (VII Moscow agreements): Methodological recommendations. Russian Scientific Society of Therapists; Scientific Society of Gastroenterologists of Russia; 2021. (in Russian)
- Pimanov S.I., Makarenko E.V. Updated recommendations: Maastricht VI/Florence consensus on the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Consilium Medicum*. 2022; 24(12): 851-9. DOI: 10.26442/20751753.2022.12.202045. (in Russian)
- Isaeva G.Sh., Valieva R.I. Biological properties and virulence of *Helicobacter pylori*. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2018; 20(1): 14-23. (in Russian)
- Bordin D.S., Voynovan I.N., Kolbasnikov S.V., Embutnieks Yu.V. Methods for diagnosing *Helicobacter pylori* infection in clinical practice. *Terapevticheskii arkhiv*. 2018; 12: 133-9. (in Russian)
- Akinshina Yu.A., Biketov S.F., Gashenko T.Yu., Dyatlov I.A., Zhigaleva O.N., Osin N.S. et al. Research, development, production and implementation of "A set of methodological, reactive and technical means for clinical laboratory diagnostics of socially significant infectious diseases. Elektrogorsk; GGTU; 2023:325. (in Russian)
- Akinshina Yu.A., Mardany S.G. Rapid self-test to detect SARS-CoV-2 in human saliva. In the book: High-tech laboratory technologies for clinical medicine. XXVIII All-Russian scientific and practical conference with international participation. Moscow: 2023: 3-4. (in Russian)
- Akinshina Yu.A., Mardany S.G. Immunochromatographic test for semi-quantitative determination of prostate-specific antigen (PSA) in human serum, plasma or whole blood "ICA-PSA". *Novosti GGTU. Meditsina, farmatsiya*. 2023; 2: 9-14. (in Russian)
- Seryakova P.V., Akinshina Yu.A., Mardany S.G. Development of an immunochromatographic test system for the detection of total antibodies to *T. pallidum*. In the collection: Medicine and pharmacy: past, present, future: Collection of scientific materials of the III All-Russian scientific and practical conference with international participation. Orekhovo-Zuevo: GGTU, JSC "EKOlab"; 2022: 129-31. (in Russian)
- Akinshina Yu.A., Mardany S.G., Rotanov S.V., Pomazanov V.V., Kiseleva V.A. About the quantitative determination of D-dimer in blood by immunochromatographic method. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2022; 67(2): 91-6. (in Russian)
- Akinshina Yu.A., Mardany S.S., Kiseleva V.A. Immunochromatographic test for the differentiated detection of antibodies of classes M and G to the SARS-CoV-2 coronavirus. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika*. 2020; 65(11): 688-92. (in Russian)

REFERENCES

- Bordin D.S., Shengeliya M.I., Ivanova V.A., Voynovan I.N. History of the discovery of the bacterium *Helicobacter pylori*. *Terapevticheskii arkhiv*. 2022; 94(2): 283-8. DOI: 10.26442/00403660.2022.02.201377. (in Russian)
- Warren J.R., Marshall B.J. Unidentified curved bacilli on gastric epi-