

УДК 579.6

DOI: 10.17072/1994-9952-2019-3-309-313.

Д. Н. Смирнова<sup>a</sup>, Н. В. Богачева<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Вятский государственный университет, Киров, Росси

<sup>b</sup> Кировский ГМУ Минздрава России, Киров, Россия

## ОБОСНОВАНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИММУНОХРОМАТОГРАФИЧЕСКОГО АНАЛИЗА В ЗАВИСИМОСТИ ОТ ЛОКАЛИЗАЦИИ ДЕТЕКТИРУЕМОГО АНТИГЕНА

Цель работы – определение влияния локализации детектируемого антигена на чувствительность иммунохроматографического метода. Оценивали чувствительность иммунохроматографической тест-системы «РЭД *Helicobacter pylori*», предназначенной для детекции фермента *H. pylori* – уреазы. В качестве исследуемого материала использовали чистую культуру *H. pylori*, а также коммерческий антиген AGHPY-0100 («Arista Biologicals», США), в состав которого входят внутриклеточные белки *H. pylori*, ассоциированные с генами *cagA* (120 kd), *vacA* (87 kd) и уреазой. При тестировании с коммерческим антигеном AGHPY-0100 порог чувствительности тест-системы «РЭД *Helicobacter pylori*» составил не менее 20 нг/мл, что свидетельствует о ее высокой чувствительности. При тестировании с цельной корпускулярной культурой *H. pylori* чувствительность оказалась значительно ниже и составила  $1.1 \times 10^{10}$  м.к.  $\times$  см<sup>-3</sup>. Экспериментальные данные подтверждают гипотезу о том, что если иммунохроматографическая тест-система направлена на выявление внутриклеточного антигена, то высокой чувствительности можно добиться только при тестировании предварительно выделенного и очищенного антигена микроорганизма. При разработке подобных тест-систем можно ожидать, что они будут преимущественно качественными, а не количественными.

**Ключевые слова:** *Helicobacter pylori*; детектируемый антиген; *cagA* и *vacA*; фермент уреазы; иммунохроматографическая тест-система; чувствительность иммунохроматографического анализа.

D. N. Smirnova<sup>a</sup>, N. V. Bogacheva<sup>b</sup>

<sup>a</sup> Vyatka State University, Kirov, Russian Federation

<sup>b</sup> Kirov State Medical University of the Ministry of Health of Russia, Kirov, Russian Federation

## JUSTIFICATION OF SENSITIVITY OF THE IMMUNOCHROMATOGRAPHIC ANALYSIS DEPENDING ON LOCALIZATION OF THE DETECTED ANTIGEN

The aim of the work was to determine the effect of localization of the detected antigen on the sensitivity of the immunochromatographic method. The sensitivity of the immunochromatographic test system "RED *Helicobacter pylori*" intended for the detection of the ferment of *H. pylori*-urease was evaluated. As the test material used a pure culture of *H. pylori*, as well as the commercial antigen AGHPY-0100 ("Arista Biologicals", USA), composed of intracellular *H. pylori* proteins associated with *cagA* genes (120 kd) and *vacA* (87 kDa) and urease. According to the results of testing with commercial antigen AGHPY-0100, the sensitivity threshold of the test system "RED *Helicobacter pylori*" was not less than 20 ng/ml, which indicates a high sensitivity of the test system. When tested with whole corpuscular culture of *H. pylori*, the sensitivity was significantly lower and amounted to  $1.1 \times 10^{10}$  cm<sup>-3</sup>. Experimental data confirm the hypothesis that if the immunochromatographic test system is aimed at the detection of intracellular antigen, then high sensitivity can be achieved only by testing the pre-isolated and purified antigen of the microorganism. When developing such test systems, it can be expected that they will be mostly qualitative, not quantitative.

**Key words:** *Helicobacter pylori*; detectable antigen; *cagA* and *vacA*; urease enzyme; immunochromatographic test system; sensitivity of immunochromatographic analysis.

Хеликобактериоз – инфекционное заболевание, вызываемое бактерией *Helicobacter pylori*, которая имеет выраженную тропность к эпителию желу-

дочно-кишечного тракта человека и животных [Госманов, Нургалиев, Нургалиев, 2012].

Основными антигенами *H. pylori*, играющими значительную роль в патогенезе *H. pylori*-

ассоциированных заболеваний и представляющими интерес для разработки различных тест-систем и вакцинных препаратов, являются VacA-цитотоксин, CagA-протеин и другие высокомолекулярные белки, уреазы, липополисахарид клеточной стенки, специфический водорастворимый протеин [Гордина, Богачева, Дармов, 2017].

Вакуолизирующий цитотоксин VacA вызывает образование вакуолей в эпителиоцитах и их гибель. В гене *vacA*, ответственном за синтез цитокина, выделяют сигнальный регион – s и срединный – m, в каждом из которых – по два аллельных варианта – s1 и s2, m1 и m2 [Макаренко, Воропаева, 2004]. Штаммы с генотипом *vacAs1m1* продуцируют увеличенное количество цитотоксина по сравнению со штаммами *vacAs2m2*, и поэтому чаще ассоциированы с гастроуденальными язвами [Макаренко, Воропаева, Матвеев, 2009].

Протеин CagA ассоциирован с язвенной болезнью, раком желудка и лимфомой. Считается, что *cagA*+-штаммы *H. pylori* и, особенно *cagA*+*vacA*+ штаммы, в значительно большей мере стимулируют пролиферативную активность эпителиоцитов слизистой оболочки желудка, чем *cagA*-негативные. 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 и атрофического гастрита в 3 раза выше по сравнению с инфицированными *cagA*-негативными штаммами. Генотип *cagA*+*vacA*+ достоверно чаще ассоциируется с гастроуденальной язвой [Cittely et al., 2002]. В связи с этим детекция белков патогенности *H. pylori* и, в первую очередь, белка CagA, является критерием отбора лиц для назначения эрадикационной терапии.

Достаточно высока значимость в патогенезе хеликобактериоза фермента уреазы, защищающего микроорганизм от агрессивного воздействия соляной кислоты желудочного сока путем разрушения мочевины с образованием углекислого газа и аммиака. Уреаза имеет белковую природу и состоит из двух субъединиц UreA (29,5 кДа) и UreB (66 кДа). Уреаза вырабатывается в процессе жизнедеятельности внутри клетки и выделяется в окружающую среду. Определение уреазы или антител к ней является основой диагностических тестов на косвенное обнаружение в организме данного патогена [Гордина, Богачева, Дармов, 2017].

Диагностика большинства инфекционных заболеваний, в том числе и хеликобактериоза, направлена на детекцию антигенов возбудителя заболевания. Большинство используемых в настоящее время диагностических 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 легионеллеза [Ярков и др., 2009], бруцеллеза [Бызова и др., 2012], псевдотуберкулеза [Богачева, Елагин, Печенкин, 2016], сапа и мелиоидоза [Федюкина, Ветчинин, Баранова, 2015].

Основные же антигены патогенности *H. pylori* расположены внутриклеточно.

Цель работы – определение влияния локализации целевого антигена на чувствительность иммунохроматографического метода анализа.

## Материал и методы исследования

### Материал

В качестве культур для тестирования были выбраны *H. pylori*, хранящиеся в музейной коллекции кафедры микробиологии «Вятского государственного университета». Данные культуры были получены от лиц, имеющих в анамнезе заболевания желудочно-кишечного тракта. Использовали чистую культуру микроорганизма, принадлежность которой к *H. pylori* была подтверждена молекулярно-генетическим, биохимическим и бактериологическим методом, а также коммерческим антигеном AGHPY-0100 («Arista Biologicals», США), в состав которого входят внутриклеточные белки *H. pylori*, ассоциированные с генами *cagA* (120 кД) и *vacA* (87 кД) и уреазой.

### Методы исследования

Культуры *H. pylori* выращивали на селективной питательной среде – колумбийском кровяном агаре с антибиотиками амфотерицином и ванкомицином в анаэробных условиях при температуре 37°C в течение 3–5 сут.

Принадлежность культур к *H. pylori* подтверждалась бактериологическими и биохимическими методами, к числу которых относятся оксидазный тест «Охi-тест» («Микро-Ла-Тест», Россия), уреазный тест и каталазный тест, методом ПЦР при использовании коммерческих тест-систем «Хеликопол VA», «Хеликопол CA», «Хеликопол IA», «Хеликопол BA» (Россия), «ДНК-технологии» (Россия), методом иммунохроматографии при использовании коммерческой тест-системы «РЭД *Helicobacter pylori*» (Россия). Иммунохроматографический анализ проводили с использованием коммерческой тест-системы «РЭД *Helicobacter pylori*» (Россия), предназначенной для индикации фермента уреазы *H. pylori*.

## Результаты и их обсуждение

Принцип иммунохроматографического анализа заключается в специфическом взаимодействии клеток *H. pylori* с моноклональными антителами, конъюгированными с окрашенной меткой. В аналитической зоне образовавшийся комплекс взаимодействует с моноклональными антителами, иммобилизованными на поверхности мембраны. В контрольной зоне тест-полоски окрашенный иммунокомплекс образуется вне зависимости от наличия в тестируемом биологическом материале клеток *H. pylori*.

Если в анализируемом образце присутствуют клетки *H. pylori*, то на тест-полоске образуются две параллельные окрашенные линии (красная аналитическая, обозначенная буквой Т, и зеленая контрольная, обозначенная буквой С), что указывает на положительный результат анализа. В том случае, если в анализируемом образце нет клеток *H. pylori*, то на тест-полоске образуется одна зеленая контрольная линия (С), что свидетельствует об отрицательном результате анализа.

На первом этапе провели тестирование иммунохроматографической тест-системы «РЭД *Helicobacter pylori*» с использованием антигена AGHPY-0100 с исходной концентрацией 2.5 мг/мл, который предварительно развели до концентрации 20 мкг/мл буфером для растворения образца, входящего в состав набора. Далее сделали ряд последовательных разведений антигена с шагом 10 и получили концентрации антигена 20 000, 200, 20, 2 нг/мл.

В круглое окошко кассеты (S) вносили 100 мкл раствора антигена AGHPY-0100 с определенной концентрацией и через 10 мин. визуально оценивали результаты анализа (рис. 1).



Рис. 1. Проверка чувствительности иммунохроматографической тест-системы «РЭД *Helicobacter pylori*» с антигеном AGHPY-100.

Концентрация антигена, нг/мл: 1 – 20 000 2 – 200, 3 – 20, 4 – 2

По результатам тестирования с коммерческим антигеном AGHPY-0100 порог чувствительности тест-системы «РЭД *Helicobacter pylori*» составил не менее 20 нг/мл, что свидетельствует о высокой чувствительности тест-системы.

На следующем этапе работы провели тестирование иммунохроматографической тест-системы с инактивированной культурой *H. pylori*, концентрация которой с использованием отраслевого стандарта мутности ФГБУ «НЦЭСМП» МЗ РФ (СО 42-28-85П) была определена как  $1 \times 10^{10}$  м.к.  $\times$  см<sup>-3</sup> (цельная культура, смытая с чашки Петри). С цельной культурой результат тестирования оказался положительным. Далее сделали следующий шаг – проверили чувствительность тест-системы, используя миллиардную культуру *H. pylori*. Результат оказался отрицательным.

На рис. 2 представлен результат тестирования иммунохроматографической тест-системы «РЭД *Helicobacter pylori*» со штаммом 116 *H. pylori*.

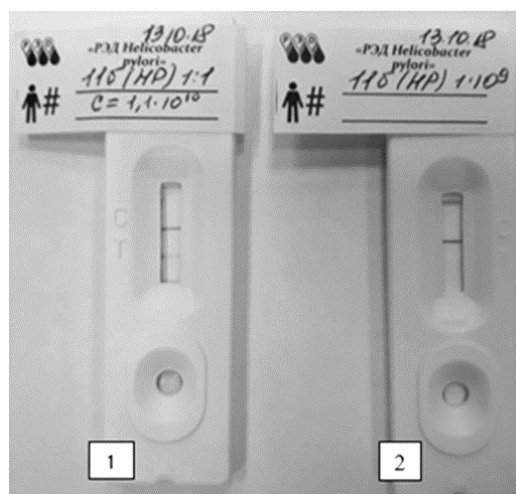


Рис. 2. Результат тестирования иммунохроматографической тест-системы «РЭД *Helicobacter pylori*» со штаммом 116 *H. pylori*

В предыдущих работах [Смирнова, Богачева, Дармов, 2018] мы уже говорили о том, что порог чувствительности иммунохроматографических тест-систем, определенный по биологической концентрации клеток в сравнении с таковой, определенной по оптической концентрации, может быть выше, и это может быть связано с тем, что антиген CagA *H. pylori* имеет внутриклеточную локализацию. В данной работе мы подтвердили наше утверждение, что если целевые антигены (белок CagA, уреазы и др.) расположены внутриклеточно, а не являются поверхностными антигенами целого корпускулярного микроорганизма, то о высокой чувствительности тест-системы можно говорить только при тестировании ее с коммерческим антигеном или с антигеном, предварительно выделенным из биологического материала, полученного от пациента.

При разработке тест-систем на поверхностные антигены бактерий трудностей с тестируемым материалом не возникает. Для тестирования подходят как чистая культура микроорганизма, так и биоматериал, полученный непосредственно от пациента (кал, мокрота, кровь). Чувствительность

подобных тест-систем, например, для выявления *Legionella pneumophila* составляет  $1 \times 10^5$  м.к.  $\times$  см<sup>-3</sup> [Ярков и др., 2009], *Yersinia pseudotuberculosis* – от  $5 \times 10^5$  м.к.  $\times$  см<sup>-3</sup> [Богачева, Елагин, Печенкин, 2016].

В связи с этим при разработке иммунохроматографических тест-систем, направленных на детекцию внутриклеточных патогенов, порог их чувствительности нельзя сравнивать с порогом чувствительности тест-систем, разработка которых направлена на детекцию поверхностных антигенов. Это обосновывает и тот факт, что большинство подобных тест-систем являются качественными, а не количественными.

### Выводы

1. Чувствительность иммунохроматографической тест-системы «РЭД *Helicobacter pylori*» («РЭД», Россия) при тестировании с коммерческим антигеном АГНРУ-0100 («Arista Biologicals», США), в состав которого входят внутриклеточные белки *H. pylori*, ассоциированные с генами *cagA*, *vacA*, уреазой, оказалась высокой и составила не менее 20 нг/мл.

2. Чувствительность иммунохроматографической тест-системы «РЭД *Helicobacter pylori*» («РЭД», Россия), предназначенной для выявления уреазы *H. pylori*, с целым инактивированным корпускулярным микроорганизмом, оказалась низкой, и составила  $1.1 \times 10^{10}$  м.к.  $\times$  см<sup>-3</sup>.

3. На примере оценки иммунохроматографической тест-системы, предназначенной для выявления *H. pylori*, обоснована особенность чувствительности иммунохроматографического анализа в зависимости от локализации детектируемого антигена: у иммунохроматографических тест-систем, направленных на детекцию внутриклеточных патогенов, порог их чувствительности нельзя сравнивать с порогом чувствительности тест-систем, разработка которых направлена на детекцию поверхностных антигенов. В первом случае – это в большей степени качественные, а, во втором – количественные иммунохроматографические тест-системы.

Авторы выражают глубокую благодарность фирме ООО «Российская экспресс диагностика» за предоставление тест-систем «РЭД *Helicobacter pylori*» для проведения исследований.

### Библиографический список

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

Бызова Н.А. и др. Разработка иммунохроматографической тест-системы для экспрессной детекции липополисахаридного антигена и клеток возбудителя бруцеллеза крупного рогатого скота // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. Т. 48, № 6. С. 653–661.

Гордина А.В., Богачева Н.В., Дармов И.В. Обоснование перспективных методов выделения антигенов // Общество, наука, инновации. НПК – 2017: сб. статей. Киров, 2017. С. 9–16.

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

Макаренко Е.В., Воронаева А.В. Гены *vacA* *cagA* *babA* *Helicobacter pylori* у больных дуоденальной язвой и хроническим гастритом // Вестник ВГМУ. 2004. Т. 3, № 1. С. 74–77.

Макаренко Е.В., Воронаева А.В., Матвеев М.Е. Влияние генотипов *Helicobacter pylori* на морфологические показатели слизистой оболочки желудка у больных дуоденальной язвой и хроническим гастритом // Вестник ВГМУ. 2009. Т. 8, № 3. С. 1–15.

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. № 4. С. 242–246.

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

Ярков С.П. и др. Выявление возбудителя легионеллеза иммунохроматографией с визуальной и видеодигитальной детекцией // Проблемы особо опасных инфекций. 2009. № 2. С. 61–64.

Cittely D.M. et al. *Helicobacter pylori* genotypes in non atrophic gastritis are different of the found in peptic ulcer, premalignant lesions and gastric cancer in Colombia // Rev. Med. Chil. 2002. Vol. 130 (2). P. 143–151.

### References

Bogacheva N.V., Elagin G.D., Pechenkin D.V. [Development of monoclonal immunochromatographic test system for the detection of *Yersinia pseudotuberculosis* serogroup I]. *Problemy osobo opasnykh infekcij*. N 2 (2016): pp. 65-68. (In Russ.).

Byzova N.A., Zherd'ev A.V., Eskendirova S.Z. et al. [Development of immunochromatographic test system for express detection of lipopolysaccharide antigen and bovine brucellosis pathogen cells].

- Prikladnaja biochimija i microbiologija*. V. 48, N 6 (2012): pp. 653-661. (In Russ.).
- Gordina V.A., Bogacheva N.V., Darmov I.V. [Justification of the promising methods for the isolation of antigens]. *Obščestvo, nauka, inovacii* [Society, science and innovation. NPK-2017: collection of articles: all-Russian annual scientific and practical conference]. Kirov, 2017, pp. 9-16. (In Russ.).
- Gosmanov R.G., Nurgaliev F.M., Nurgaliyev R.M. [Helicobacteriosis]. *Učenyje zapiski Kazanskoj gosudarstvennoj akademii veterinarnoj mediciny im. N.Ė. Baumana*. (2012): pp. 68-74. (In Russ.).
- Makarenko E.V., Voropaeva A.V. [Genes vacA, cagA, babA of *Helicobacter pylori* in patients with duodenal ulcer and chronic gastritis]. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*. V. 3, N 1 (2004): pp. 74-77. (In Russ.).
- Makarenko E.V., Voropayeva A.V., Matveenko M.E. [Effect of *Helicobacter pylori* genotypes on the morphological parameters of the gastric mucosa in patients with duodenal ulcer and chronic gastritis]. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo medicinskogo universiteta*. V. 8, N 3 (2009): p. 1-15. (In Russ.).
- Smirnova D.N., Bogacheva N.V., Darmov I.V. [Development of an experimental sample of immunochromatographic test system for detection of pathogenicity protein CagA *Helicobacter pylori*]. *Kliničeskaja laboratornaja diagnostika*. N 4 (2018): pp. 242-246. (In Russ.).
- Fedyukina G.N., Vetchinin S.S., Baranova E.V. [Obtaining of the components of the immunochromatographic test for the detection of causative agents of glanders and melioidosis]. *Biotehnologija*. N 1 (2015): pp. 85-92. (In Russ.).
- Yarkov S.P., Tret'yakov S.I., Basharova L.A. et al. [Detection of the pathogen of legionellosis by immunochromatography with visual and video detection]. *Problemy osobo opasnykh infekcij*. N 2 (2009): pp. 61-64. (In Russ.).
- Cittely D.M., Huertas M.G., Martinez J.D. et al. *Helicobacter pylori* genotypes in non atrophic gastritis are different of the found in peptic ulcer, premalignant lesions and gastric cancer in Colombia. *Rev. Med. Chil*. V. 130, 2 (2002): pp. 143-151.

Поступила в редакцию 29.04.2019

#### Об авторах

Смирнова Дарья Николаевна, аспирант кафедры микробиологии  
ФГБОУВО «Вятский государственный университет»  
**ORCID:** 0000-0002-0090-1891  
610000, г. Киров, ул. Московская, д. 36;  
cards1993@mail.ru, 8-9823870393

Богачева Наталья Викторовна, доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры микробиологии и вирусологии  
ФГБОУВО «Кировский государственный медицинский университет Минздрава России»  
**ORCID:** 0000-0002-7021-6232  
610998, г. Киров, ул. К. Маркса, д. 112;  
bogacheva70@mail.ru

#### Информация для цитирования:

Смирнова Д.Н., Богачева Н.В. Обоснование чувствительности иммунохроматографического анализа в зависимости от локализации детектируемого антигена // Вестник Пермского университета. Сер. Биология. 2019. Вып. 3. С. 309–313. DOI: 10.17072/1994-9952-2019-3-309-313.

Smirnova D.N., Bogacheva N.V. [Justification of sensitivity of the immunochromatographic analysis depending on localization of the detected antigen]. *Vestnik Permskogo universiteta. Biologija*. Iss. 3 (2019): pp. 309-313. (In Russ.). DOI: 10.17072/1994-9952-2019-3-309-313.

#### About the authors

Smirnova Darya Nikolaevna, graduate student of the Department of Microbiology  
Vyatka State University.  
**ORCID:** 0000-0002-0090-1891  
36, Moskovskaya str., Kirov, Russia, 610000;  
cards1993@mail.ru, 8-982-387-03-93

Bogacheva Natalia Viktorovna, doctor of medicine, associate professor, professor of the Department of Microbiology and Virology  
Kirov State Medical University of the Ministry of Health of Russia.  
**ORCID:** 0000-0002-7021-6232  
112, K. Marx str., Kirov, Russia, 610998;  
bogacheva70@mail.ru

