

КЛИНИЧЕСКАЯ ЛАБОРАТОРНАЯ ДИАГНОСТИКА

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2025

Ротанов С.В.¹, Акиншина Ю.А.², Марданлы С.Г.^{2,3}, Марданлы А.Г.⁴

ЭКСПРЕСС – ВЫЯВЛЕНИЕ ВОЗБУДИТЕЛЕЙ ОСТРЫХ КИШЕЧНЫХ ВИРУСНЫХ ИНФЕКЦИЙ У ЧЕЛОВЕКА

¹ Федеральное бюджетное учреждение науки «ГНЦ прикладной микробиологии и биотехнологии» Роспотребнадзора (ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора), 142279, г. о. Серпухов, п. Оболенск, Россия

² АО «ЭКОлаб», 142530, г. Электрогорск, Россия

³ ГОУВО МО «Государственный гуманитарно-технологический университет» (ГОУ ВО МО «ГГТУ»), 142611, г. Орехово-Зуево, Россия;

⁴ Нахчыванский Государственный университет, AZ7012, Нахчыван, Азербайджан

Современные иммунохроматографические point of care тесты имеют высокие показатели диагностической информативности и требуют незначительное по длительности время для их выполнения, что делает их востребованными при клиническом обследовании и постановке этиологического диагноза у больных с признаками острого гастроэнтерита. Представлены этапы разработки и технических испытаний нового набора реагентов «Тест-система иммунохроматографическая для качественного определения антигенов рота-, адено-, норо- и астровирусов в образцах кала «ИХА-ОКИ вирус-тест», представляемого АО «ЭКОлаб» для одноэтапного экспресс определения в образцах кала человека этиологических факторов из числа основных вирусных кишечных патогенов с целью первичной дифференцированной диагностики возбудителей острых кишечных инфекций. В технических испытаниях продемонстрирована высокая диагностическая информативность результатов разработанного набора.

Ключевые слова: острая кишечная инфекция; Rotavirus, Adenoviridae; Norovirus; Astrovirus; медицинская микробиология; иммунохроматография; лабораторная диагностика; набор реагентов

Для цитирования: Ротанов С.В., Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Марданлы А.Г. Экспресс – выявление возбудителей острых кишечных вирусных инфекций у человека. *Биотехнология в медицине и фармации*. 2024; 1 (1): 29–36.

DOI: <https://doi.org/10.51620/10.51620/3034-7211-2024-1-1-29-36>

EDN: VTUGVT

Для корреспонденции: Ротанов Сергей Владимирович, ведущий научный сотрудник отдела информатизационных технологий ФБУН «ГНЦ ПМБ» Роспотребнадзора; e-mail: svrotanov@mail.ru

Финансирование. Исследование выполнено в соответствии с научным производственным планом АО «ЭКОлаб», при полном финансировании предприятия.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила 17.01.2024

Принята к печати 28.02.2024

Rotanov S.V.¹, Akinshina Yu.A.², Mardanly S.G.^{2,3}, Mardanly A.G.⁴

RAPID DETECTION THE CAUSATIVE AGENTS OF ACUTE INTESTINAL VIRAL INFECTIONS IN HUMANS

¹ Federal budgetary institution of Science «State Scientific Centre of Applied Microbiology and Biotechnology of Rosпотребнадзор (FSBI "SSC PMB" of Rosпотребнадzor), 142279, Serpukhov, Obolensk, Russia;

² JSC «EKOlab», 142530, Elektrogorsk, Russia;

³ State educational institution of higher education of the Moscow region «State Humanitarian University of Technology» (GGTU), 142611, Orekhovo-Zuyevo, Russia;

⁴ Nakhchivan State University, AZ7012, Nakhchivan, Azerbaijan

Modern immunochromatographic point of care tests have high diagnostic information content and require little time for their implementation, which makes them in demand in clinical examination and etiological diagnosis of patients with signs of acute gastroenteritis. The paper presents the stages of development and technical testing of a new reagent kit "Immunochromatographic test system for qualitative determination of rota-, adeno-, noro- and astrovirus antigens in stool samples "IKHA-OKI virus-test" presented by JSC "EKOlab" for one-stage express determination of etiological factors from among the main viral intestinal pathogens in human stool samples for the purpose of primary differential diagnosis of causative agents of acute intestinal infections. Technical testing demonstrated high diagnostic information content of the results of the developed kit.

Key words: acute intestinal infection; Rotavirus; Adenoviridae; Norovirus; Astrovirus; medical microbiology; immunochromatography; laboratory diagnostics; reagent kit

For citation: Rotanov S.V., Akinshina Ju.A., Mardanly S.G., Mardanly A.G. Express detection the causative agents of acute intestinal viral infections in humans. *Biotechnologiya v meditsine i farmatsii (Biotechnology in medicine and pharmacy)*. 2024; 1(1): 29–36 (in Rus).

DOI: <https://doi.org/10.51620/10.51620/3034-7211-2024-1-1-29-36>

EDN: VTUGVT

For correspondence: *Sergey V. Rotanov*, leading researcher of the department of information technologies of the FSBSI “State Scientific Center of Applied Medical Biology” of Rospotrebnadzor; e-mail: svrotanov@mail.ru

Funding. The study was carried out in accordance with the scientific production plan of JSC ECOLab with full funding from the enterprise.

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

Information about authors:

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

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

Mardanly S.G., <https://orcid.org/0000-0003-3650-2363>;

Mardanly A.G., <https://orcid.org/0009-0001-1591-1849>.

Received 17.01.2024

Accepted 28.02.2024

Актуальность. Учитывая анатомо-физиологическую незрелость тканей желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) детей, диарея является наиболее частой неспецифической защитной реакцией организма ребенка на самые разные изменения в составе потребляемой воды и пищи, а также при развитии системной патологии, сопровождающейся общей гипертермией или интоксикацией. После рождения ребенок постепенно утрачивает материнские защитные иммунные антитела, которыми наделяла его мать в процессе внутриутробного развития и грудного вскармливания, против значительного разнообразия инфекционных агентов. Перечисленные положения обуславливают то обстоятельство, что острые кишечные инфекции (ОКИ) часто отмечаются у детей особенно ранних сроков жизни.

У взрослых людей при несоблюдении санитарно-гигиенических правил или нарушении технологии приготовления пищи патогены алиментарным путем могут поступать и инфицировать ЖКТ, вызывая явления пищевой токсико-инфекции или интоксикации. Перечень возбудителей ОКИ человека разнообразен, в их число входят: простейшие и паразиты, облигатно и условно патогенные бактерии, многочисленные вирусы и грибы, нередко встречаются микст-поражения несколькими патогенами одновременно. Клинические проявления ОКИ не заставляют себя долго ждать (6–8–12 часов после заражения), так как в пищеварительном тракте патогены находят для себя благоприятные условия развития.

К числу вирусов, имеющих склонность поражать слизистые оболочки ЖКТ человека с развитием острого инфекционного процесса, сопровождающегося интоксикацией и диареей, в первую очередь относят: рота-, норо- (включая вирус Норфолк), астро-, адено- (типы 40 и 41) и энтеровирусы. Другие вирусы (как казуальные агенты указанной клинической картины) встречаются существенно реже; но имеется большая группа вирусов с тропностью к поражению тканей печени и селезенки (вирусы гепатитов человека) или системным инфекциям с умеренно выраженным гастроинтестинальным синдромом (цитомегаловирусы и другие). Эпидемиологический анализ заболеваемости населения показывает, что в развитых странах до 90 % небактериальных гастроэнтеритов обусловлен рота- и норовирусами [1–6].

Ротавирусы (*Rotavirus*) наиболее изучены среди вирусных возбудителей ОКИ, имеют двунитевую фрагментированную РНК; их электронно-микроскопический вид напоминает колесо (по латыни *rota* – «ко-

лесо»). 11 фрагментов генома ротавируса кодируют синтез шести структурных (VP_1 - VP_7) и пяти неструктурных (NSP_1 - NSP_5) белков. Сердцевина (core) ротавируса окружена трехслойным белковым капсидом со структурным белком VP_6 , по его строению выделяют 9 серологических групп ротавирусов (людей поражают типы 1–4, 8 и 9, а типы 5–7 вирусов – животных) [2, 6, 7]. Наружный капсид содержит структурные белки VP_4 (Р-протеин) и VP_7 (G-протеин), их функциональное назначение – первичная адсорбция на эпителиоцитах слизистой оболочки тонкого кишечника и обеспечение проникновения внутрь клетки (подразделяют G и Р серотипы вирионов).

Ротавирусы устойчивы в окружающей среде; они наиболее часто являются причиной гастроэнтеритов у детей; у взрослых, благодаря приобретенному иммунитету, ротавирусную инфекцию наблюдают реже. Ротавирус высоко контагиозен; характерно заражение в холодное время года. Развивается острый гастроэнтерит (с тошнотой, рвотой и диареей), иногда в сочетании с респираторным синдромом (и лихорадкой), при отсутствии лечения может происходить обезвоживание организма (I–II степени). Иногда инфекция протекает скрыто. После заболевания иммунитет нестойкий (вырабатываются антитела к белкам VP_4 и VP_7), возможны рецидивы болезни. С каждым заражением появляется иммунитет к определенному серотипу вируса, и последующие атаки протекают легче. К пятилетнему возрасту практически все дети переносят ротавирусную инфекцию [3, 6].

Норовирусы (*Norovirus*) – РНК-содержащие вирусы; по статистическим данным они – наиболее частые возбудители вспышек ОКИ небактериальной этиологии, это объясняется высокой устойчивостью вируса в окружающей среде и низкой инфицирующей дозой (достаточно всего 10 вирионов). Инфекция проявляется клиникой острого гастроэнтерита (острый гастрит, рвота, а диарея менее выражена); характерно острое начало болезни с повышения температуры, головной боли, озноба, головокружения и миалгии. Норовирусы классифицируют на 6 геногрупп: для человека патогенными являются GI (род *Norwalk*), GII и GIV; с преобладанием GII (причем GII.3, GII.6, GII.12 ассоциированы с передачей через продукты питания) [2–5].

Эта инфекция проявляется как в виде единичных случаев, так и вспышек; восприимчивы все возрастные группы, но чаще – дети школьного возраста и взрослые. Инфицирование норовирусами вызывает обра-

зование сывороточных IgM и IgG, а также синтез IgA в тонком кишечнике (блокировка вирусных частиц и препятствие повторному инфицированию эпителиоцитов слизистой оболочки кишечника). Установлена генетически обусловленная невосприимчивость к норовирусам у лиц с III и IV группами крови (до 15 % в популяции), в то время как к люди с I группой крови болеют чаще. Формируется кратковременный (6–14 недель) и долгосрочный (9–15 месяцев) специфический иммунитет, на более длительное время (27–42 месяца) иммунитет не сохраняется [4–5].

Размножение ротавирусов и норовирусов происходит в эпителиоцитах 12-перстной кишки, что вызывает их гибель и замещение незрелыми клетками; это приводит к клинике осмотической диареи, потере электролитов и дегидратации II–III степени.

Астровирусы (*Astrovirus*) содержат РНК, определяют меньшую долю среди ОКИ человека в сравнении с рота- и норовирусами; они чаще встречаются у детей в возрасте 2–4 лет, но способны поражать и взрослых. Среди астровирусов выделяют *Avastrovirus* (вирус птиц) и *Mamastrovirus* (вирус млекопитающих); у последних идентифицировано 8 серотипов: детей чаще поражают 1 и 2 серотипы, а лиц старшего возраста – серотип 4 [4, 5]. Инфекция проявляется симптомами острого гастроэнтерита, у трети больных – с явлениями колита. Заболевание длится не более пяти дней, специфического лечения не требует и заканчивается выздоровлением; нередко инфекция протекает бессимптомно. Выделение вируса с калом происходит в течение трех недель с момента заражения, что особенно важно учитывать при диагностике. Установлено, что в возрасте 3–4 лет до 71 % детей имеют в крови антитела к астровирусам, хотя в анамнезе отсутствовали указания на перенесение заболевания. Отмечается рост астровирусных диарей у лиц с иммунодефицитами (включая ВИЧ-инфекцию), а также при нозокомиальных инфекциях.

Кишечные аденовирусы (*Adenovirus*) содержат двуцепочечные линейные ДНК; в отношении развития ОКИ в настоящее время доказано значение аденовирусов группы F (40 и 41 типы). Аденовирусная кишечная инфекция не обладает клиническими особенностями, позволяющими дифференцировать ее от других ОКИ. В России аденовирусы группы F занимают 4–5 место по распространенности среди вирусных ОКИ (2–22 % случаев диарейных инфекций у детей). Аденовирусы передаются при контакте с инфицированным человеком или через обсемененные предметы, полотенце и ручки водопроводных кранов. Вирус сохраняется в воде при недостаточном хлорировании бассейнов. Реконвалесцент выделяет вирус до 50 дней и более. Чаще болеют дети от 6 месяцев до 2 лет (особенно во вновь сформированных детских коллективах) [3–5].

Необходимо иметь в виду, что до 65–67 % случаев острого гастроэнтерита у людей остаются с неуточненной этиологией, что обусловлено частыми отказами от обращения за неотложной медицинской помощью и применением с целью самолечения разных лекарственных средств, обладающих антимикробной активностью. Для своевременной этиологической диагностики и назначения адекватной этиологической терапии важно максимально оперативно выявлять патогены, в том числе и вирусной природы. В проведенных

клинико-эпидемиологических исследованиях было показано, что в разных возрастных группах пациентов с гастроэнтеритами частота выявления вирусных и бактериальных отличается; так, у детей до 3 лет вирусы вызывают до 80–90 % ОКИ, а бактериальные патогены – остальные 10–20 %; а с увеличением возраста доля вирусных возбудителей понижается, достигая у людей зрелого возраста 30 % ОКИ [1–2].

В клинических лабораториях медицинских учреждений в настоящее время для выделения и идентификации инфекционных агентов применяют разные подходы в зависимости от природы предполагаемого патогена, что бывает обусловлено особенностями анамнеза болезни или характерными клиническими признаками.

Изучение бактериальных возбудителей ОКИ начинают с выделения чистой культуры из каловых масс путем культивирования посевов на плотных питательных средах, нередко с применением селективных добавок; полученную культуру изучают под микроскопом и в автоматических биохимических анализаторах с использованием набора биохимических субстратов. Для дифференцированного определения вирусных патогенов применяют современные высокочувствительные и трудозатратные молекулярно-генетические исследования. И только в редких случаях в научных целях или для депонирования вирусы культивируют на чувствительных клеточных линиях или куриных эмбрионах. Исследования XX века позволили глубже изучить патогены вирусной природы, выявить в их структуре наиболее характерные генетические, ферментные или белково-мукополисахаридные маркеры, а также разработать более краткие по времени технологические подходы их детекции (например: иммунохроматографический анализ). Таким образом, необходимо признать, что в практической медицине в настоящее время имеются пробелы с этиологической верификацией патогенов у больных с ОКИ.

Цель исследования – разработка экспресс – набора реагентов для качественного определения рота-, адено-, норо- и астровирусов в образцах кала пациентов в формате иммунохроматографического (ИХ) теста для первичной этиологической диагностики.

Материалы и методы. В основу разработки дизайна нового набора реагентов были взяты прототипы для ИХ качественного определения в биологических пробах от человека маркеров, специфичных для изучаемых патогенов [8–12]. Инновационным явился подход мультипараметрического определения сразу нескольких вирусных маркеров в рамках одноэтапного лабораторного теста. Как следует из цели работы, биологическими образцами для выявления вирионов должны служить образцы кала от больного человека.

Для проведения технических испытаний на разных этапах разработки были заготовлены образцы проб кала, полученные от больных с разными вирусными ОКИ (n = 250) и от клинически здоровых лиц (n = 200), которые обращались за медицинской помощью и наблюдались в Диагностическом референт-центре “El’Clinic” АО «ЭКО-лаб» (лицензия № ЛО-50-01-006551 от 08.04.2015 г.); биологические образцы предоставлены в соответствии с договором о безвозмездном научном сотрудничестве.

Для первичной аттестации клинических образцов кала и панели стандартных образцов предприятия (СОП)

и проведения испытаний нового ИХ набора были приобретены коммерческие ИХ наборы реагентов сравнения: «ЭТА Ротавирус и Адено-вирус» для качественного обнаружения антигенов ротавирусов и/или аденовирусов в образцах кала человека методом иммунохроматографии» (ООО «Эталон Продакшн», Россия; РУ № РЗН 2022/16954 от 18.04.2022); «ЭТА Норовирус GI и GII» для качественного обнаружения антигенов Норовируса 1-й и/или 2-й геногруппы в кале человека методом иммунохроматографии» (ООО «Эталон Продакшн», Россия; РУ № РЗН 2022/18476 от 07.10.2022); «Диагностический экспресс-тест для качественного определения антигена астровируса “Astrovirus One Step Assay” («Новамед Лтд.», Израиль; РУ № ФСЗ 2011/09636 от 18.05.2021).

В качестве референтного метода для верификации возможных расхождений в сравнительных ИХ испытаниях был применен метод более высокого уровня точности и надежности – полимеразная цепная реакция (ПЦР) и необходимый набор реагентов для выявления возбудителей вирусных кишечных инфекций этим методом «АмплиСенс® ОКИ виро-скрин-FL» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, Россия; РУ № РЗН 2021/13776 от 23.01.2023).

Все лабораторные исследования проводили в строгом соответствии с Инструкциями по применению используемых наборов реагентов.

Результаты и обсуждение. В соответствии с наработанным в предшествующие годы опытом исследований по созданию новых ИХ наборов реагентов в рамках настоящего проекта были проведены необходимые подготовительные работы:

- из золотохлористоводородной кислоты по методу Френса получали наночастицы коллоидного золота (НЧ-КЗ) размером 30–80 нм, с максимальным поглощением проходящего света полученным продуктом при $\lambda = 524\text{--}525\text{ нм}$;

- на основе НЧ-КЗ готовили конъюгаты с моноклональными антителами к целевым для определения

вирусам (рота-, адено-, норо- 1 и 2 геногруппы, астровирусу) и с мышинными иммуноглобулинами класса G (IgG); опытно-экспериментальным путем подбирали количественные соотношения реагентов для оптимальной и стабильной конъюгации;

- путем вариации и комбинаторного подбора готовили мембраны с совместимыми между собою конъюгатами. В соответствии с назначением мультипараметрического набора опытным путем были разработаны 3 варианта мембран с конъюгатами: вариант 1 – конъюгаты НЧ-КЗ с моноклональными антителами к рота- и аденовирусам и НЧ-КЗ с мышинными IgG; вариант 2 – конъюгаты НЧ-КЗ с моноклональными антителами к норовирусам 1 и 2 геногрупп и НЧ-КЗ с мышинными IgG; вариант 3 – конъюгаты НЧ-КЗ с моноклональными антителами к астровирусу и НЧ-КЗ с мышинными IgG;

- в соответствии с сущностью приготовленных мембран с конъюгатами готовили 3 варианта иммуносорбентов: 1 – для определения адено- и ротавирусов: для этого в тестовой зоне мембраны иммобилизовали моноклональные антитела к аденовирусам (линия Т-1) и моноклональные антитела к ротавирусам (линия Т-2), в зоне контроля – козы антитела к IgG мыши (линия С); 2 – для определения норовирусов: в тестовой зоне иммобилизовали моноклональные антитела к генотипу 1 (линия Т-1) и моноклональные антитела к генотипу 2 (линия Т-2), в зоне контроля – козы антитела к IgG мыши (С); вариант 3 – для определения астровирусов: в тестовой зоне иммобилизовали моноклональные антитела к астровирусам (линия Т-1), а в зоне контроля – козы антитела к IgG мыши (линия С).

Стандартизованным способом осуществляли сборку композитных ИХ мембран: на клеевую плотную подложку полилита закрепляли мембрану для нанесения образцов, соответствующее друг другу сочетание мембраны для конъюгатов и иммуносорбент, а также мембрану для адсорбции растворимых продуктов, не вступивших в реакцию при исследовании (рис. 1).

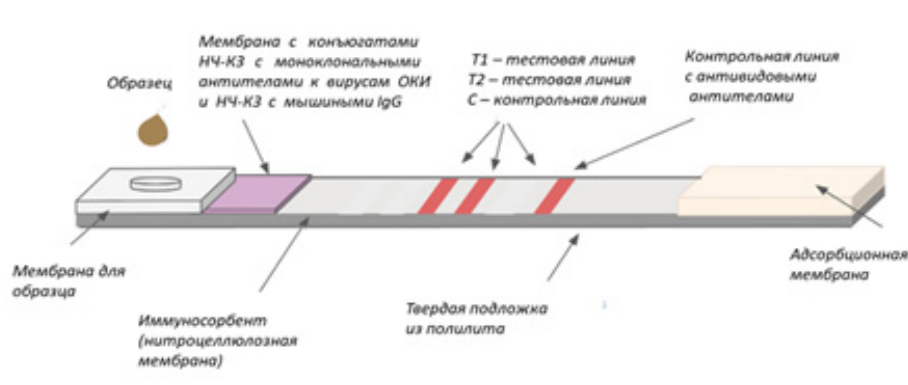


Рис. 1. Схема сборки композитной ИХ мембраны и схема проведения исследования

Подготовленные и высушенные композитные мембраны нарезали в поперечном направлении на узкие тест-полоски (стрипы шириной по 4 мм) для последующего их монтажа в соответствующие ложбинки пластиковых кассет, имеющих округлые окошки «S» (Sample) для нанесения на мембраны изучаемого биоматериала (солюбилизированных образцов кала) и

продолговатые окошки – для визуального учета результатов исследования по тестовым линиям (Т-1 и Т-2) и линиям контроля «С» (Control). Подготовленный макет нового набора для ИХ исследования получил обозначение «ИХА-ОКИ-вирус-тест» Тест-система иммунохроматографическая для качественного определения антигенов рота-, адено-, норо- и астровирусов в образцах

кала» (рис. 2).

Базовая комплектация нового набора реагентов со-держала ИХ тест-кассету (в индивидуальной упаковке с поглотителем влаги), флакон-капельницу (для разведе-ния исследуемого образца кала в буферном раство-ре), пипетку Пастера (для отбора жидкого кала) и ин-струкцию по применению.

В соответствии с нормативными требованиями раз-работки и организации производства новых диагно-стических наборов на предприятии была разработана и выпущена в натуральном виде панель Стандартных образцов предприятия (СОП-268), необходимая для контроля качества компонентов разрабатываемого ИХ набора на разных этапах производства. Панель состо-яла из четырех контрольных образцов: образец № 1 не содержал антигены рота-, норо-, адено- и астрови-русов; образец № 2 содержал антигены вирусов ОКИ ниже предполагаемой аналитической способности раз-работанного набора: ротавирус в концентрации < 3,12 нг/мл, антигены аденовируса – < 0,78 нг/мл, антигены норовируса 1-й геногруппы – < 91,4 нг/мл, норовируса 2-й геногруппы – < 10 нг/мл; образец № 3 содержал анти-гены вирусов ОКИ на уровне аналитической возмож-ности разработанного набора: ротавируса в concentra-ции 3,12 нг/мл, аденовируса – 0,78 нг/мл, астровируса норовируса 1-й геногруппы – 91,4 нг/мл, 2-й геногруппы – 10 нг/мл); образец № 4 содержал антигены рота-вируса в концентрации, превышающей 3,12 нг/мл, аде-новируса – > 0,78 нг/мл, астровируса норовируса 1-й геногруппы – > 91,4 нг/мл, 2-й геногруппы – > 10 нг/мл).

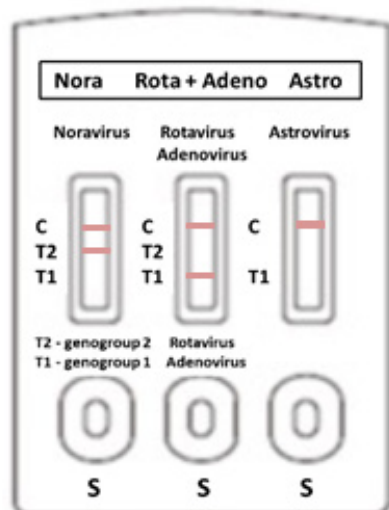


Рис. 2. Схема размещения стрипов на кассете «ИХА-ОКИ-вирус-тест» для иммунохроматографического качественного определе-ния ротавирусов, аденовирусов, норовирусов генотипа-1 и -2, а также астровирусов в образцах кала пациентов

Принцип работы. В основе разработанного набо-ра «ИХА-ОКИ-вирус-тест» реализована технология качественного одноэтапного ИХ определения специ-фических маркеров вирусов ОКИ человека (рота-, адено-, норо- и астровирусов) в солиобилизованных образцах кала, полученных от пациента. Исследование проводится при комнатной температуре, для каждого образца применяют новую тест-кассету из набора.

При наличии в исследуемом образце кала антигенов одного или нескольких вирусов ОКИ человека они на мембране реагируют с соответствующими специфи-ческими конъюгатами (моноклональные антитела к антигенам вируса, меченные НЧ-КЗ) и на соответствую-щей тестовой линии – с локально иммобилизованны-ми специфическими моноклональными антителами к антигенам соответствующего вируса; в результате двух последовательных реакций локально в Т зоне концен-трируются сложные иммунные комплексы («антитело иммуносорбента + вирусный антиген исследуемой про-бы + антитело конъюгата + НЧ-КЗ»), которые за счет цвета НЧ-КЗ окрашивают тест-линию в розовый цвет с интенсивностью пропорционально содержанию анти-гена в исследуемой пробе. Окрашенная линия в Т-зоне по окончании исследования – положительный резуль-тат (качественное выявление в пробе кала соответ-ствующего антигена вирусов ОКИ), а при отсутствии окрашенной линии – отрицательный (отсутствие в про-бе антигенов вирусов ОКИ или их наличие, но в коли-честве ниже уровня аналитической чувствительности теста). Не вступившие в реакцию конъюгаты НЧ-КЗ с мышинными IgG взаимодействуют с антивидовыми ко-зыми антителами к IgG мыши в С-зоне с образованием контрольной окрашенной полосы. Контрольная линия должна проявляться по окончании любого исследова-ния, независимо от наличия в тестируемых образцах антигенов вирусов ОКИ. Это внутренний контроль ва-лидности рабочей мембраны и правильного выполне-ния исследования. Отсутствие окрашенной С-линии в конце исследования означает, что результаты тестиرو-вания недействительны, требуется повторить исследо-вание с другой валидной тест-кассетой.

Проведение производственных технических испытаний. Контрольные образцы СОП-268 (двух серий) исследованы с наборами «ИХА-ОКИ-вирус-тест» трех опытно-экспериментальных серий, в пяти повторностях. Результаты испытаний установили развитие выраженной окраски через 10–12 минут в С-зонах для образцов № 1 и № 2 СОП-268 и в Т- и С-зонах – для образцов № 3 и № 4 СОП-268, что оценено как полное соответствие свойств набора «ИХА-ОКИ-вирус-тест» требованиям производственного ТУ 21.20.23-268-70423725-2024 по показателям аналитической чувствительности и специфичности, а также воспроизводимости и времени достижения устойчивых результатов.

В результате этих испытаний оценены аналитиче-ские показатели нового набора: аналитическая чувстви-тельность в отношении: ротавируса – 3,12 нг/мл; адено-вируса – 0,78 нг/мл; норовируса 1-й геногруппы – 91,4 нг/мл; норовируса 2-й геногруппы – 10 нг/мл. Чувстви-тельность набора (определена с образцами № 3 и № 4 СОП-268, содержащими антигены рота-, адено-, норо-, астровирусов; как процент положительных результатов) составляет 100 %. Специфичность набора (определена с образцами № 1 и № 2 СОП-268, не содержащими анти-гены рота-, адено-, норо-, астровирусов или содержа-щими их в концентрации ниже порога определения; как процент отрицательных результатов) составляет 100 %. Прецизионность исследования (оценена на образцах № 1 и № 4 СОП-268) составляет 100 %.

Для изучения показателей диагностической инфор-

мативности результатов исследования с новым набором, оценки потенциальной интерференции и перекрестного влияния различных факторов были подготовлены модельные контрольные материалы (таблица 1), содержавшие (№ п/п 1–13; $n = 292$) и не содержавшие (№ п/п 14–31; $n = 291$) вирусы ОКИ.

Все модельные контрольные образцы разливали в пробирки-эппендорфы, маркировали, замораживали и хранили в морозильной камере при температуре минус 20° С; перед испытаниями их постепенно оттаивали и доводили до комнатной температуры.

Для проведения *внутренних клинических испытаний по оценке диагностической информативности разработанного набора реагентов* были использованы клинические образцы (пробы кала), потенциально содержавшие (в таблице 1 № п/п 1–5; $n = 100$) и не со-

державшие (в таблице № п/п 10; $n = 100$) вирусы ОКИ человека; их исследовали с разработанным набором и соответствующими ИХ наборами реагентов сравнения (см. раздел «Материалы и методы»). В испытаниях получены сходные результаты; единичные расхождения результатов ИХ исследований с новым набором и соответствующими наборами реагентов сравнения были верифицированы в ПЦР с референтным набором «АмплиСенс® ОКИ виро-скрин-FL» (ФБУН «ЦНИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора). По результатам проведенных сравнительных испытаний были охарактеризованы показатели диагностической информативности разработанного набора «ИХА-ОКИ-вирус-тест»: диагностическая чувствительность составила 97,16–100 % (при $P = 95$ %), диагностическая специфичность – 97,04–100 % (при $P = 95$ %).

Характеристика модельных контрольных материалов

№ п/п	Характеристика панели образцов кала человека	Количество образцов
1	образцы, содержавшие антигены ротавируса	50
2	образцы, содержавшие антигены аденовируса	30
3	образцы, содержавшие антигены астровируса	8
4	образцы, содержавшие антигены норовируса I геногруппы	6
5	образцы, содержавшие антигены норовируса II геногруппы	6
6	образцы, содержавшие антигены только одного из вирусов ОКИ и витамин С в концентрации до 0,3 мг/мл	24
7	образцы, содержавшие антигены только одного из вирусов ОКИ и витамин В ₅ в концентрации до 0,3 мг/мл	24
8	образцы, содержавшие антигены только одного из вирусов ОКИ и витамин В ₆ в концентрации до 0,3 мг/мл	24
9	образцы, содержавшие антигены только одного из вирусов ОКИ и ибупрофен в концентрации до 3 мг/мл	24
10	образцы, содержавшие антигены только одного из вирусов ОКИ и азитромицин в концентрации до 3 мг/мл	24
11	образцы, содержавшие антигены только одного из вирусов ОКИ и гемоглобин в концентрации до 5 мкг/мл	24
12	образцы, содержавшие антигены только одного из вирусов ОКИ и билирубин в концентрации до 0,5 мкг/мл	24
13	образцы, содержавшие антигены только одного из вирусов ОКИ и лактоферрин в концентрации до 5,0 мкг/мл	24
14	образцы, не содержавшие антигены рота-, адено-, норо- и астровирусов	100
15	образцы, не содержавшие антигены рота-, адено-, норо- и астровирусов и содержавшие витамин С в концентрации до 0,3 мг/мл	20
16	образцы, не содержавшие антигены рота-, адено-, норо- и астровирусов и содержавшие витамин В ₅ в концентрации до 0,3 мг/мл	20
17	образцы, не содержавшие антигены рота-, адено-, норо- и астровирусов и содержавшие витамин В ₆ в концентрации до 0,3 мг/мл	20
18	образцы, не содержавшие антигены рота-, адено-, норо- и астровирусов и содержавшие ибупрофен в концентрации до 3,0 мкг/мл	20
19	образцы, не содержавшие антигены рота-, адено-, норо- и астровирусов и содержавшие азитромицин в концентрации до 3,0 мкг/мл	20
20	образцы, не содержавшие антигены рота-, адено-, норо- и астровирусов и содержавшие гемоглобин в концентрации до 5,0 мкг/мл	20
21	образцы, не содержавшие антигены рота-, адено-, норо- и астровирусов и содержавшие билирубин в концентрации до 0,5 мкг/мл	20
22	образцы, не содержавшие антигены рота-, адено-, норо- и астровирусов и содержавшие лактоферрин в концентрации до 5,0 мкг/мл	20
23	образцы, не содержавшие антигены вирусов ОКИ и содержавшие <i>Corynebacterium diptheriae</i> (бацилла Леффлера) в концентрации $1,0 \times 10^7$ клеток /мл	3
24	образцы, не содержавшие антигены вирусов ОКИ и содержавшие <i>Shigella sonnei</i> в концентрации $1,0 \times 10^7$ клеток /мл	5
25	образцы, не содержавшие антигены вирусов ОКИ и содержавшие <i>Pseudomonas aeruginosa</i> в концентрации $1,0 \times 10^7$ кл / мл	2
26	образцы, не содержавшие антигены вирусов ОКИ и содержавшие <i>Clostridium difficile</i> в концентрации $1,0 \times 10^7$ клеток /мл	5
27	образцы, не содержавшие антигены вирусов ОКИ и содержавшие <i>Shigella dysenteriae</i> в концентрации $1,0 \times 10^7$ клеток /мл	5
28	образцы, не содержавшие антигены вирусов ОКИ и содержавшие <i>Shigella flexneri</i> в концентрации $1,0 \times 10^7$ клеток /мл	2
29	образцы, не содержавшие антигены вирусов ОКИ и содержавшие <i>Helicobacter pylori</i> в концентрации $1,0 \times 10^7$ клеток /мл	2
30	образцы, не содержавшие антигены вирусов ОКИ и содержавшие <i>Proteus mirabilis</i> в концентрации $1,0 \times 10^7$ клеток /мл	2
31	образцы, не содержавшие антигены вирусов ОКИ и содержавшие <i>Escherichia coli</i> в концентрации $1,0 \times 10^7$ клеток /мл	5

Влияния на результаты тестов потенциально интерферирующих эндогенных и экзогенных факторов и перекрестной реактивности со стороны микроорганизмов. С двумя экспериментальными сериями «ИХА-ОКИ-вирус-тест» были исследованы модельные контрольные материалы (образцы кала), содержавшие и не содержавшие антигены вирусов ОКИ с добавлени-

ями потенциально интерферирующих веществ эндогенной и экзогенной природы: витаминов С, В₅ и В₆, ибупрофена, азитромицина, гемоглобина, билирубина, лактоферрина в повышенных концентрациях (см. таблицу 1: № п/п 6–13; $n = 192$ и № п/п 15–22; $n = 160$ соответственно), а также модельные контрольные материалы (образцы кала), не содержавшие антигены ви-

русов ОКИ, но включавшие один из 9 бактериальных агентов: *Corynebacterium diphtheriae* – бацилла Леффлера, *Shigella sonnei*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Shigella flexneri*, *Clostridium difficile*, *Shigella dysenteriae*, *Helicobacter pylori*, *Proteus mirabilis*, *E. coli* (см. таблицу 1: № п/п 23–31; $n = 31$).

Результаты ИХ исследования 352 образцов, содержащих ($n = 192$) и не содержащих ($n = 160$) антигены вирусов ОКИ (рота-, адено-, норо- или астровируса), но включавших добавку потенциально интерферирующих факторов, не отличались по времени появления, характеру и степени выраженности специфического ответа от аналогичных параметров исследования в контроле с образцами, не содержащими указанные потенциально интерферирующие факторы (в таблице 1 № п/п 1–5; $n = 100$ и № п/п 10; $n = 100$ соответственно). Результаты исследования 31 модельного контрольного материала без антигенов вирусов ОКИ, но с дополнительным привнесением микроорганизмов, которые могут присутствовать в кале обследуемых пациентов, демонстрировали полное отсутствие специфического ответа в Т-зонах и не отличались от контроля (с образцами, не содержащими антигены вирусов ОКИ и изучаемые микроорганизмы).

Таким образом, было установлено отсутствие интерферирующего и перекрестного влияния со стороны изученных биохимических, лекарственных и микробных факторов на специфический ответ и время достижения устойчивого результата в ИХ исследовании с тест-кассетами набора «ИХА-ОКИ-вирус-тест».

Результаты проведенных испытаний позволили представить разработанный на АО «ЭКОлаб» новый набор реагентов «ИХА-ОКИ-вирус-тест» Тест-система

иммунохроматографическая для качественного определения антигенов рота-, адено-, норо- и астровирусов в образцах кала» для официальной регистрации в Российской Федерации в установленном порядке и получить соответствующее регистрационное удостоверение: РУ № РЗН 2024/21948 от 30.01.2024 г. (рис. 3), что разрешает рекомендовать его широкое внедрение в учреждениях здравоохранения при оказании медицинской помощи населению.

Заключение. Проведенные на предприятии исследования позволили разработать и организовать производственный выпуск нового набора реагентов «ИХА-ОКИ-вирус-тест». Набор позволяет в формате одноэтапного иммунохроматографического экспресс-теста оперативно получить дифференцированную информацию об инфицировании пациента пятью основными вирусами острых кишечных инфекций человека (ротавирусами, аденовирусами, норовирусами 1-й или 2-й генотипы и астровирусами).

Набор успешно прошел государственные испытания и получил разрешение на применение в медицинских организациях Российской Федерации (РУ № РЗН 2024/21948 от 30.01.2024 г.). Опытные-производственные серии нового набора реагентов показали его достаточно высокое качество по показателям аналитической чувствительности и специфичности, воспроизводимости результатов и времени достижения устойчивых результатов. Не было выявлено интерферирующего и перекрестно реагирующего влияния на результаты иммунохроматографических исследований со стороны экзогенных и эндогенных вещества химической или микробной природы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Никонорова М.А., Карбышева Н.В., Шевцова Е.А., Бесхлебная О.В. Этиология острых кишечных инфекций вирусной природы в Алтайском крае. *Эпидемиология и инфекционные болезни*. 2020; 25(5): 200–209. DOI: <https://doi.org/10.17816/EID58736>
2. Манкевич Р.Н., Галькевич Н.В., Матуш Л.И. Вирусные диареи у детей: Учебно-методическое пособие. Минск: БГМУ, 2021.
3. Кишечные инфекции: Лекция. Available <https://ivgmu.ru/attachment/s/48300?ysclid=lue2ecnaht867715939> [29.03.2024].
4. Малов В.А., Горобченко А.Н., Городнова Е.А. Вирусные гастроэнтериты. *Лечащий врач*. 2002; 11
5. Лукьянова А.М., Бехтерева М.К., Птичникова Н.Н. Клинико-эпидемиологическая характеристика вирусных диарей у детей. *Журнал инфектологии*; 2014; 6(1): 60–66.
6. Ротавирусный гастроэнтерит у детей: Клинические рекомендации. ID:755. Минздрав РФ, 2023.
7. Новокшенов А.А., Мазанкова Л.Н., Учайкин В.Ф. Клинические рекомендации по диагностике и лечению ОКИ у детей в зависимости от типа диареи. *В помощь практическому врачу*; 2013; 4 (8): 62–73.
8. Малышев В.В., Змеева Т.А., Гумилевский Б.Ю. Прорывные технологии в пробоподготовке и детекции кишечных вирусов и их маркеров в полевых условиях. *Известия ГГТУ. Медицина, фармация*. 2022; 2: 9–13.
9. Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В. и др. О количественном определении D-димера в крови иммунохроматографическим методом. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2022; 67(2): 91–96. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-02-91-96
10. Серякова П.В., Марданлы С.Г. Разработка иммунохроматографической тест-системы для качественного определения иммуноглобулина. *Известия ГГТУ. Медицина, фармация*. 2022; 1: 53–54.
11. Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В. и др. Разработка иммунохроматографического набора реагентов для выявления ротавирусов. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2023; 68 (11): 672–679. DOI: 10.51620/ 0869-2084-2023-68-11-672-679



Рис. 3. Регистрационное удостоверение на медицинское изделие «ИХА-ОКИ-вирус-тест» Тест-система иммунохроматографическая для качественного определения антигенов рота-, адено-, норо- и астровирусов в образцах кала»

12. Акиншина Ю.А., Марданлы С.Г., Ротанов С.В. Об иммунохроматографическом выявлении *Helicobacter pylori* у человека. *Клиническая лабораторная диагностика*. 2024; 69 (2): 14–18. DOI: 10.18821/0869-2084-2024-69-2-14-18.

REFERENCES

1. Nikonorova M.A., Karbysheva N.V., Shevtsova E.A., Beskhlebova O.V. Etiology of acute intestinal infections of viral character in the Altai territory. *Epidemiologiya i infektionnye bolezni*. 2020; 25(5): 200–209. DOI: <https://doi.org/10.17816/EID58736> (in Russian)
2. Mankevich R.N., Galkevich N.V., Matush L.I. Viral diarrhea in children: Educational and methodological manual. Minsk: BSMU, 2021. (in Russian)
3. Intestinal infections: Lecture. Available <https://ivgmu.ru/attachments/48300?ysclid=lue2ecnaht867715939> [29.03.2024]. (in Russian)
4. Malov V.A., Gorobchenko A.N., Gorodnova E.A. Viral gastroenteritis. *Lechashchij vrach*. 2002; 11. (in Russian)
5. Lukyanova A.M., Bekhtereva M.K., Ptichnikova N.N. Clinical and epidemiological characteristics of viral diarrhea in children. *Zhurnal infektologii*; 2014; 6(1): 60–66. (in Russian)
6. Rotavirus gastroenteritis in children: Clinical recommendations. ID:755. Ministry of Health of the Russian Federation, 2023. (in Russian)
7. Novokshonov A.A., Mazankova L.N., Uchaikin V.F. Clinical guidelines for the diagnosis and treatment of acute intestinal infections in children depending on the type of diarrhea. *V pomoshch' prakticheskomu vrachu*; 2013; 4 (8): 62–73. (in Russian)
8. Malyshev V.V., Zmeeva T.A., Gumilevsky B.Yu. Breakthrough technologies in sample preparation and detection of intestinal viruses and their markers in field conditions. *Izvestiya GGTU. Meditsina, farmatsiya*. 2022; 2: 9–13. (in Russian)
9. Akinshina Yu.A., Mardany S.G., Rotanov S.V. et al. On the quantitative determination of D-dimer in blood by immunochromatographic method. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2022; 67(2): 91–96. DOI: 10.51620/0869-2084-2022-67-02-91-96 (in Russian)
10. Seryakova P.V., Mardany S.G. Development of an immunochromatographic test system for the qualitative determination of myoglobin. *Izvestiya GGTU. Meditsina, farmatsiya*. 2022; 1: 53–54. (in Russian)
11. Akinshina Iu.A., Mardany S.G., Rotanov S.V. et al. Development of an immunochromatographic set of reagents for the detection of rotaviruses. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2023; 68 (11): 672–679. DOI: 10.51620/0869-2084-2023-68-11-672-679 (in Russian)
12. Akinshina Yu.A., Mardany S.G., Rotanov S.V. On the immunochromatographic detection of *Helicobacter pylori* in humans. *Klinicheskaya laboratornaya diagnostika*. 2024; 69 (2): 14–18. DOI: 10.18821/0869-2084-2024-69-2-14-18 (in Russian)