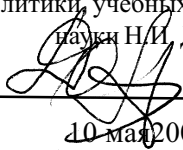


# МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

## МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

СОГЛАСОВАНО

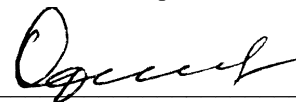
Заместитель начальника  
Главного управления кадровой  
политики, учебных заведений и  
науки Н.И. Доста



10 мая 2000 г.

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель  
министра здравоохранения  
В.М. Ореховский



11 мая 2000 г.

Регистрационный № 43-0002

## МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ HELICOBACTER PYLORI

***Учреждение-разработчик:***

Витебский государственный медицинский университет

***Авторы:*** канд. мед. наук М.Р. Конорев, канд. мед. наук  
В.К. Окулич, д-р мед. наук, проф. А.Н. Косинец,  
д-р мед. наук, проф. А.М. Литвяков

***Рецензент:*** канд. мед. наук, доц. Н.Н. Силивончик

В методических рекомендациях подробно описаны современные методы диагностики *Helicobacter pylori*.

Методические рекомендации предназначены для врачей гастроэнтерологов, хирургов, врачей микробиологов, бактериологов, врачей общей практики, участковых терапевтов.

Методические рекомендации утверждены Министерством здравоохранения Республики Беларусь в качестве официального документа.

## ВВЕДЕНИЕ

*Helicobacter pylori* (НР) является наиболее распространенной хронической бактериальной инфекцией у человека, колонизируя приблизительно 60% мирового населения. По данным Республиканского центра гастроэнтерологии РБ, НР присутствует в желудке у 38,0% лиц без признаков воспаления, у 61,6% — с признаками хронического гастрита и у 71,0% лиц — с пептической язвой ДПК. К настоящему времени доказана роль НР в патогенезе острого и хронического гастрита и дуоденита, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, MALT-лимфомы и, по некоторым данным, рака желудка. После эрадикации НР в слизистой оболочке желудка и метаплазированной слизистой ДПК отмечается: 1) исчезновение воспалительных изменений в слизистой; 2) снижение частоты рецидивов язвы, повторной перфорации и язвенного кровотечения; 3) гистологическая ремиссия MALT-лимфомы желудка 4) уменьшение риска возникновения рака желудка. Поэтому, достоверная диагностика НР в организме больного необходима для назначения адекватного лечения данной инфекции.

Методы выявления НР в организме человека делятся на прямые, основанные на непосредственном обнаружении бактерии или фрагментов бактериальной ДНК в биоптате слизистой или биологических выделениях, и непрямые, основанные на выявлении IgA и IgG антител в сыворотке крови или продуктов распада мочевины в выдыхаемом воздухе без использования биоптата или биологических жидкостей.

## КЛАССИФИКАЦИЯ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ НР

### **IA. Прямые методы с использованием биопсийного материала**

1. Морфологический (окраска бактерии в гистологических препаратах методом Гимзы серебрением по Вартин-Старри и акридиновым оранжевым).
2. Генетический (полимеразная цепная реакция с использованием биоптата).
3. Бактериологический (выделение чистой культуры).
4. Биохимический (уреазный тест с биоптатом слизистой).

### **IB. Прямые методы с использованием биологических выделений**

1. Морфологический (окраска бактерии в мазках осадка желудочного содержимого методом Гимзы, серебрением по Вартин-Старри и акридиновым оранжевым).
2. Генетический (полимеразная цепная реакция с использованием осадка желудочного содержимого).
3. Биохимический (уреазный тест с использованием осадка желудочного содержимого).

### **II. Непрямые методы**

1. Серологический (иммуноферментный анализ).
2. Биохимический (дыхательный тест).

## МОРФОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД

Морфологические методы выявления НР в биопсийном материале с использованием различных окрасок. Все они достаточно специфичны. Наиболее чувствительными являются окраски акридиновым оранжевым (85%) и красителем Гимзы (79%), несколько менее чувствительными — окраски по Граму (72%) и серебрением по Вартин-Старри (67%). Обнаружить НР можно и на обычных, окрашенных гематоксилином и эозином препаратах.

Морфологические методы выявления НР в осадке желудочного содержимого натошак с использованием различных окрасок. НР появляется в желудочном содержимом в результате десквамации клеток покровного эпителия в просвет желудка с находящимися на их поверхности микроорганизмами. Все они достаточно специфичны. Наиболее чувствительными являются окраски акридиновым оранжевым (98,0%) и серебрением по Вартин-Старри (92,0%), несколько менее чувствительными — красителем Гимзы (85,0%).

*Получение гистологических срезов из биопсийного материала.*

Гастробиоптаты фиксируют в 10% нейтральном забуференном растворе формалина при pH 7,0 по Лилли и заливают в парафин. Для окраски используют гистологические срезы толщиной 5–6 мкм.

*Получение мазка биоптата слизистой оболочки.*

Мазок биоптата слизистой оболочки готовят путем прижатия биоптата с помощью пинцета к предметному стеклу в виде отпечатка с последующей его фиксацией в 96° спирте в течение 15 мин.

*Получение мазка осадка желудочного содержимого.*

Порцию желудочного содержимого, полученную натошак, центрифугируют при 1,5 тыс. об/мин в течение 10 мин, до разделения желудочного содержимого на компоненты (осадок и надосадок). Из осадка желудочного содержимого, с помощью пастеровской пипетки, готовят препараты путем распределения 0,04–0,06 мл (2–3 капли) на площади 25x50 мм (500 мм<sup>2</sup>), высушивают и фиксируют в парах формалина 20 мин.

### **Окраска акридиновым оранжевым**

Приготовление красителя: акридиновый оранжевый — 20 мг растворяют в 190 мг буфера (110 мл 1н ацетата натрия и 90 мл 1н HCl). Раствор хранят в темном флаконе в холодильнике.

*Окраска.* Депарафинированные срезы или фиксированные мазки помещают в воду, окрашивают в растворе акридинового оранжевого 2 мин, промывают в воде, высушивают на воздухе. Срезы просветляют в ксилоле (минуя спирты), заключают в балъзам. После окраски мазка осадка желудочного содержимого последний только высушивают и производят бактериоскопию.

*Результаты:* При ультрафиолетовом освещении бактерии легко различимы по оранжевой флюоресценции, флюоресценция желудочного эпителия зеленая в апикальной части и оранжево-желтая у основания клеток, эритроцитов — зеленая, лейкоцитов — оранжевая.

## **Окраска серебрением по Вартин-Старри**

### *Приготовление растворов:*

1. Подкисленная вода: три- или бидистиллированная вода — 1000 мл, лимонная кислота — 10,0 г.
2. Раствор нитрата серебра: нитрат серебра — 2,0 г, подкисленная вода — 100 мл. Для приготовления 1% раствора добавить равный объем подкисленной воды.
3. Раствор гидрохинона: гидрохинон — 0,15 г, подкисленная вода — 100 мл.
4. Раствор желатины: особо чистая желатина — 10,0 г, подкисленная вода — 100 мл.
5. Проявитель: 2% раствор нитрата серебра — 1,5 мл, 5% раствор желатины — 3,75 мл, 0,15% раствор гидрохинона — 2,0 мл. Растворы подогревают до 50–60°C, смешивают в указанном порядке. Используют немедленно.

### *Окраска:*

1. Депарафинированные срезы или фиксированные мазки доводят до подкисленной воды.
2. 1% раствор нитрата серебра при 50–60°C — 30 мин.
3. Проявитель — 3–5 мин (срезы становятся светло-коричневыми).
4. Промывают в теплой воде (50–60°C), затем в дистиллированной воде.
5. Обезвоживают, просветляют, заключают в канадский бальзам. После окраски мазка осадка желудочного содержимого последний только высушивают и производят бактериоскопию.

*Результаты:* НР — черные, хорошо видна их изогнутая форма. Фон от желто-зеленого до светло-коричневого.

## **Окраска по методу Гимзы**

### *Приготовление растворов:*

1. Основной раствор: краска Гимзы — 1,0, глицерин — 54 мл, спирт 96° — 84,0 мл (профильтровать).
2. Рабочий раствор: основной раствор — 1,0 мл, дистиллированная вода — 38 мл, 0,1% раствор углекислого калия — 2,0 мл.

### *Окраска:*

1. Депарафинированные срезы или фиксированные мазки помещают в дистиллированную воду на 10–15 мин.
2. Рабочий раствор — 20 мин.
3. Промывают в дистиллированной воде.
4. Обезвоживают, просветляют, заключают в канадский бальзам. После окраски мазка биоптата слизистой или осадка желудочного содержимого последний только высушивают и производят бактериоскопию.

*Результаты:* НР окрашиваются в темно синий цвет, они хорошо видны как на поверхности эпителия, так и в глубине ямок.

**Применение морфологического метода:** используют при динамическом наблюдении и оценке лечения хронического гастродуоденита и/или язвенной болезни геликобактерной этиологии.

## МЕТОД ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ (ПЦР)

В основе метода лежит комплементарное достраивание ДНК-матрицы, осуществляемое *in vitro* с помощью фермента ДНК-полимеразы. Эта реакция носит название репликации ДНК. Естественная репликация ДНК включает в себя несколько стадий. 1) денатурация ДНК (расплетение двойной спирали, расхождение нитей ДНК); 2) образование коротких двухцепочечных участков ДНК (затравок, необходимых для инициации синтеза ДНК); 3) синтез новой цепи ДНК (комплементарное достраивание обеих цепей). Открытие термостабильной ДНК-полимеразы (Tag-полимеразы) из термофильных бактерий *Thermis aquaticus*, оптимум работы которой находится в области 70–72°C, позволило сделать процесс репликации ДНК циклическим. При многократном повторении циклов синтеза происходит экспоненциальное увеличение числа копий специфического фермента ДНК, что позволяет из небольшого количества анализируемого материала, который может содержать единичные клетки микроорганизмов получить достаточное количество ДНК копий для идентификации их методом электрофореза. Таким образом, метод ПЦР представляет собой многократное увеличение числа копий (амплификация) специфического участка ДНК катализируемое ферментом ДНК-полимеразой.

Преимущество метода ПЦР для диагностики НР:

1) выявление специфического участка ДНК НР данным методом дает прямое указание на присутствие бактерии; 2) высокая специфичность метода ПЦР задается нуклеотидной последовательностью праймеров, что исключает возможность получения ложных результатов; 3) метод ПЦР обладает высокой чувствительностью, что позволяет выявлять даже единичные бактериальные клетки. Чувствительность метода ПЦР составляет 10–1000 клеток в пробе; 4) унифицированный метод обработки биоматериала и детекции продуктов реакции, автоматизация процесса амплификации дают возможность провести полный анализ за 4–4,5 ч; 5) методом ПЦР возможно выявление НР как в биопсийном материале, так и в желудочном содержимом.

Недостатки метода: высокая стоимость оборудования и реактивов для постановки ПЦР по сравнению с некоторыми другими методами диагностики данной инфекции (морфологическим, биохимическим).

### Проведение ПЦР-анализа

*Забор клинического материала.*

Забор исследуемого материала (биоптат слизистой желудка, двенадцатиперстной кишки, десневых карманов и т.д.) производится в стерильные пробирки. Взятые пробы клинического материала могут храниться при температуре 16–20°C в морозильной камере не более 2 недель.

*Выделение ДНК из образца.*

Кусочек ткани слизистой желудка или двенадцатиперстной кишки объемом примерно 2 мм<sup>2</sup> поместить в 1,5 мл микроцентрифужную пробирку типа «Eppendorf» с 50 мкл лизирующего буфера и инкубировать при 56°C 1 ч. К полученному лизату добавляют 450 мкл денатурирующего раствора, с последующим осаждением ДНК изопропанолом (300 мкл). Детальное описание способа выделения ДНК из образца излагается в инструкции

по использованию наборов реагентов, прилагаемых к ПЦР-диагностическим наборам. Раствор очищенной ДНК можно хранить при  $-20^{\circ}\text{C}$  в течение 2 недель.

#### *Проведение ПЦР.*

Образец ДНК из обработанной клинической пробы переносится в специальную микроцентрифужную пробирку типа «Eppendorf» объемом 0,5 мл. В эту же пробирку добавляется амплификационная смесь, состоящая из воды, ПЦР-буфера, раствора дНТФ, раствора праймеров и раствора Taq-полимеразы (добавляется в смесь в последнюю очередь). Конечный объем реакционной смеси — 25 мкл. Затем в каждую пробирку добавляется одна капля минерального масла для предотвращения испарения реакционной смеси в процессе амплификации. Пробирки переносятся в программируемый термостат (амплификатор) и проводится амплификация в автоматическом режиме по заданной программе, соответствующей виду НР. Время проведения реакции составляет 2–3 ч. Контроль реакции осуществляется одновременно с постановкой ПЦР на клиническом материале. Положительный и отрицательный контроль включает в себя все компоненты реакции, но вместо материала клинического образца вносится контрольный препарат ДНК исследуемого возбудителя (положительный контроль) или соответствующее количество деионизованной воды (отрицательный контроль).

#### *Регистрация результатов.*

Амплифицированный специфический фрагмент ДНК выявляют методом электрофореза в 1% агарозном геле в присутствии бромистого этидия. Бромистый этидий образует с фрагментами ДНК устойчивое соединение, которое при облучении геля УФ-излучением с длиной волны 290–330 нм выявляется в виде светящихся полос.

*Приготовление агарозного геля.* Смесь агарозы (1,5 г; Type II: Medium EEO; Sigma), ТАЕ буфера разбавленного на дистиллированной воде в 50 раз (2 мл) и дистиллированной воды (100 мл) расплавляют в СВЧ-печи или на водяной бане, добавляют раствор бромистого этидия (1% раствор 10 мкл). Охлажденную до  $50\text{--}60^{\circ}\text{C}$  смесь тонким слоем заливают в форму и с помощью специальных гребенок делают в геле карманы для внесения образца. После застывания геля в карманы наносится амплификат (10–15 мкл), смешанный с буфером (5 мкл) для нанесения образца, содержащего краситель. Гель с образцами переносят в камеру для электрофореза, заполненную буфером камеру подключают к источнику питания (напряжение 10–15 В/см) и проводят электрофоретическое разделение продуктов амплификации в направлении от катода (–) к аноду (+) в течение 30–45 мин. Гель просматривают в ультрафиолетовом свете с помощью трансиллюминатора и фотографируют или сканируют. Результат оценивают по наличию в анализируемой пробе фрагмента ДНК, пятно которого, размером 555 нуклеотидных пар, располагается на том же уровне, что и пятно контрольного препарата ДНК. Такие фрагменты синтезируются только при наличии в исследуемом материале клеток соответствующего возбудителя. В отрицательном контрольном образце полоса, соответствующая фрагментам генома данной инфекции должна отсутствовать. Появление полосы в отрицательном контроле свидетельствует о контаминации компонентов набора.

*Применение метода полимеразной цепной реакции:* используют при неэффективности других методов диагностики НР, в связи с тем, что он является наиболее чувствительным методом для выявления геликобактериоза.

## Бактериологический метод

Предметом исследования для микробиологической диагностики НР является биоптат слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки с последующей обработкой и посевом на дифференциально-диагностические среды. Бактериологический метод дорогой, обладает невысокой специфичностью (53%) и чувствительностью (77%). В связи с этим его относят к дополнительным методам диагностики НР-инфекции.

### *Хранение и транспортировка биопсийного материала.*

1. Биоптат помещают в 20% раствор глюкозы объемом 2 мл. Он может быть использован для посева на дифференциально-диагностические среды в течение 2 ч (при хранении при +4°C — до 5 ч). Рост культуры наблюдают в 40±16% случаев. При добавлении к 2 мл глюкозы 5 мг химотрипсина рост культуры наблюдают в 90±10% случаев.

2. Использование транспортной среды Стюарта. Состав: глицерофосфат натрия 10,0 г, тиогликолат натрия 0,5 г, цистеина гидрохлорид 0,5 г, хлорид кальция 0,1 г, метиленовый синий 0,001 г, агар 5,0 г, вода дистиллированная 1,0 л. Приготовление: доводят до кипения, чтобы все компоненты полностью растворились. Разливают по небольшим герметично закрывающимся сосудам (емкостью 5–7 мл) так, чтобы они были заполнены доверху. Герметично закрывают флаконы, автоклавируют при 121°C.

### *Среды для выделения НР:*

1. Неселективные: шоколадный агар, содержащий 1% isovitalex, агар «Колумбия», содержащий 10% крови барана.

2. Селективные: агар «Колумбия», содержащий 10% крови барана, селективную добавку из антибиотиков (см. ниже), 0,01% гемина, 0,04% трифенилтетразолиума хлорида (ТТС); агар Вилькинса-Шальгрена (10% крови барана и селективная добавка из антибиотиков).

*Примеры селективных добавок из антибиотиков.* DENT (Oxoid SR 147): ванкомицин — 10 мг/л, триметоприм — 5 мг/л, цефсулодин — 5 мг/л амфотерицин — 5 мг/л. SKIRROW (Oxoid SR 69): ванкомицин — 10 мг/л, триметоприм — 5 мг/л, полимиксин В — 2500 МЕ.

Выливают транспортную среду вместе с биоптатом на среду для выделения НР, зажимают биоптат стерильным пинцетом и волнообразными движениями руки проводят биоптатом по агару стараясь не повредить поверхностный слой. Биоптат удаляют. Инкубируют среду в микроаэрофильных условиях при 37°C в течение 3–5 сут. После инкубации удостоверяются в принадлежности выросшей культуры микроорганизмов к группе грамотрицательных палочек, изогнутых или спиральных, микроаэрофильных, оксидазо-, каталазо- и уреазоположительных (см. ниже определение каталазной, оксидазной и уреазной активности). Далее отбирают хорошо изолированную колонию (прозрачные, блестящие колонии) и пересевают ее на агар для получения чистой культуры. Инкубируют среду в микроаэрофильных условиях при 37°C в течение 72 ч. Выделенные чистые культуры идентифицируют с помощью стандартных стрипов (например API-Campy) или тестов поставленных самостоятельно.

### *Идентификация выделенных чистых культур:*

Стрип API-Campy (BioMerieux, Франция) представлен 20 микропробирками, содержащими высушенные субстраты. Состоит из двух частей. Первая часть стрипа (энзимные и условные тесты) инокулируют густой суспензией, которая



регидратирует субстраты. Реакции происходят во время инкубации в анаэробных условиях: происходит изменение цвета спонтанных или после добавления реактивов реакций. Вторую часть стрипа (тесты ассимиляции или ингибиции роста) инкубируют в атмосфере  $O_2/CO_2$ . Бактерии растут, если они способны утилизировать соответствующий субстрат или если они устойчивы в тесте с антибиотиками.

После инкубации в термостате в течение 24 ч при температуре 37°C учет реакций осуществляют визуально по таблице (табл. 1). Идентификация — согласно каталога API-Campy.

### **Определение уреазной активности микроорганизмов**

*Принцип* — при взаимодействии микробной культуры с раствором мочевины происходит ее разложение под влиянием уреазы бактерий с образованием аммиака и смещением pH среды смеси в щелочную сторону. При наличии в растворе индикатора фенолового красного при этом изменяется цвет смеси на розово-красный.

*Реагенты и материалы.*

Микробная культура на плотных питательных средах; чашки Петри, пробирки.

Жидкая среда с мочевиной по Христенсену: 1) базовый раствор (1,0 г пептона бактериологического, 5,0 г NaCl, 1,0 г глюкозы, 2,0 г калия фосфорнокислого однозамещенного, 6,0 мл 0,2% водного раствора фенолового красного растворяют в 100,0 мл дистиллированной воды, устанавливают pH 6,8–6,9 и хранят при +4°C); 2) насыщенный водный раствор мочевины — 10,0 мл.

Перед определением 10,0 мл базового раствора смешивают с 0,2 мл насыщенного водного раствора мочевины.

*Техника постановки реакции.*

В 1,0 мл полученной смеси тщательно эмульгируют полную бактериальную петлю исследуемой культуры и оставляют, наблюдая за изменением цвета смеси.

Регистрацию результатов осуществляют визуально по изменению цвета среды на интенсивный розовый или красный в течение 3–5 мин.

*Применение:* является одним из основных факторов патогенности НР. Доступна для любых микробиологических лабораторий.

### **Определение редукции нитратов микроорганизмами**

*Принцип* — при взаимодействии микробной культуры с питательной средой, содержащей нитраты, в случае образования ими нитратредуктазы происходит редукция субстрата с образованием нитритов, которые выявляются с помощью солянокислого риванола по хромогенной реакции с изменением цвета смеси на розово-красный.

*Реагенты и материалы.*

Микробная культура на плотных питательных средах, 1% пептонная вода содержащая 1% нитрат натрия, индикатор на нитриты (0,1% раствор риванола и 12% раствор соляной кислоты). Его используют в виде смеси равных количеств или путем последовательного отдельного внесения ингредиентов; пробирки, пипетки, штативы и др. лабораторное оборудование.

*API-Campy*

Тест	Субстрат/реакция	Отрицательная	Положительная	НР
URE	Уреаза	желтый	красно-фиолетовый, оранжевый	+
NIT	Редукция нитратов	бесцветный	розово-пурпурный (темно-красный)	-
EST	Эстераза	бесцветный бледно-голубой	бирюзовый	-
HIP	Гиппураза	бесцветный	фиолетовый	-
GGT	Гамма-глутамил-трансфераза	бесцветный	интенсивно оранжевый	+
TTC	Редукция хлорида трифенил тетразолиума	бесцветный бледно-розовый	розовый, красный или осадок	-
PugA	Пирролидонилариламидаза	бесцветный	оранжевый	-
ArgA	L-аргининариламидаза	бесцветный	оранжевый	-
AspA	L-аспаратариламидаза	бесцветный	оранжевый	-
PAL	Щелочная фосфатаза	бесцветный	пурпурный	+
H <sub>2</sub> S	Продукция h <sub>2</sub> s	бесцветный	черный	-
GLU	Глюкоза рост	прозрачный (нет роста)	муть (рост)	-
SUT	Сукцинат рост	прозрачный	муть	-
NAL	Налидиксовая к-та чувств.	прозрачный (чувств.)	муть (устойчивость)	-
CFZ	Цефазолин чувств.	прозрачный	муть	-
ACE	Ацетат рост	прозрачный	муть	-
PRO P	Пропионат рост	прозрачный	муть	-
MLT	Малат рост	прозрачный	муть	-
CIT	Цитрат рост	прозрачный	муть	-
ERO	Эритромицин чувств.	прозрачный	муть	-
CAT	Каталаза	нет пузырьков газа	есть пузырьки газа	+

*Техника постановки реакции.*

В 8,0–10,0 мл пептонной воды с 1% нитратом натрия тщательно эмульгируют полную бактериальную петлю исследуемой культуры и помещают в термостат при 37°C. Через 6–12 или 18–24 ч в пробирку приливают 3 капли риванола, а затем 3 капли 12% раствора соляной кислоты и наблюдают за изменением окраски раствора.

Регистрацию результатов осуществляют визуально после добавления индикатора по изменению цвета среды на розово-красный.

*Применение:* используют для диагностики инфекции НР. Доступна для любых микробиологических лабораторий.

### **Определение гиппуразной активности у микроорганизмов**

*Принцип* — при взаимодействии гиппурат-гидролазы, продуцируемой микробной культурой, с раствором гиппурата натрия происходит его гидролитическое расщепление с образованием глицина, который выявляют с помощью нингидринового реактива по хромогенной реакции с изменением цвета среды на темно-фиолетовую.

*Реагенты и материалы.*

Микробная культура на плотных питательных средах, субстратный раствор гиппурата натрия, 3,5% нингидриновый реактив (3,5 г нингидрина растворяют в 100 мл смеси ацетона и бутанола, взятых в равнообъемных отношениях), дистиллированная вода; пробирки, пипетки, штативы; водяная баня, морозильник и др. лабораторное оборудование.

*Техника постановки реакции.*

Приготавливают субстратный 1% раствор гиппурата натрия в дистиллированной воде и разливают в пробирки по 0,4 мл. Пробирки, закрытые пробками, хранят в морозильнике при –20°C. При постановке эксперимента пробирки размораживают, подогревают до 37°C и в субстратный раствор засевают исследуемую культуру, которую берут с поверхности плотной агаровой среды и вносят 1–2 полные петли до получения очень густой суспензии. К опыту ставят контроли: 1) субстратный раствор + убитая кипячением исследуемая микробная культура или гетерологичная микробная культура, заведомо не расщепляющая гиппурата (отрицательный контроль); 2) субстратный раствор + гетерологичная микробная культура, гидролизующая гиппурат натрия (положительный контроль). Пробирки с посевами инкубируют в водяной бане при 37°C (или в термостате) в течение 2 ч. После этого в пробирки приливают по 0,2 мл нингидринового реактива и, не встряхивая их, продолжают инкубировать при 37°C еще в течение 10 мин, а затем учитывают результаты.

Регистрацию результатов осуществляют визуально по изменению окраски в опытной и контрольной пробках. При положительной реакции появляется темно-фиолетовая окраска среды в пробирке, при отрицательной реакции наблюдается отсутствие окраски или наличие лишь слабого фиолетового оттенка.

*Применение:* используют для диагностики НР. Доступна для любых микробиологических лабораторий.

### **Определение гамма-глутамилтрансферазной активности**

*Принцип* – взаимодействие бактериальной глутамилтрансферазы с глутамином в присутствии гидроксиламина (или гидрозина, или  $\text{NH}_3$ ) сопровождается переносом гамма-глутаминового радикала с субстрата на гидроксиламин (гидрозин, или  $\text{NH}_3$ ), при этом образуется гамма-глутамилгидроксиаминовая кислота (глутамилгидрозин или глутамин), которая выявляется с помощью цветной реакции (появление желто-зеленоватой окраски), образуемой ею с хлорным железом.

*Реагенты и материалы.*

Микробная культура на плотных питательных средах, 0,3 ммоль раствор L-глутамина, 0,3 ммоль раствор гидроксиламина, фосфатный буфер, рН 7,0; ацетатный буфер рН 5,0; 1,2 ммоль водный раствор сернокислого марганца ( $\text{MnSO}_4$ ), 5% треххлорное железо ( $\text{FeCl}_3$ ), приготовленное на 0,1 н соляной кислоте, ацетон х.ч., 2,5 н раствор соляной кислоты, 15% трихлоруксусная кислота; фарфоровая ступка, центрифуга и др. лабораторное оборудование.

Получение ацетонового порошка бактерий. Микробную культуру смывают с питательной агаровой среды буферным раствором, отмывают в нем 1–2 раза с помощью центрифугирования при 8000 об/мин. Затем осадок микробной массы заливают 5-кратным объемом нейтрального ацетона и центрифугируют при 8000 об/мин в течение 15 мин. Надосадочную жидкость отбрасывают, а 2 г осадка переносят в фарфоровую ступку, растирают с 6 мл ацетатного буфера, рН 5,0 и снова центрифугируют при 8000 об/мин в течение 30–40 мин. Осадок трижды промывают 4-кратным объемом ацетона, отделяют центрифугированием и высушивают до постоянного веса над хлористым кальцием.

*Техника постановки реакции.*

К 25 мг сухой микробной массы последовательно прибавляют 1 мл раствора L-глутамина + 1 мл раствора гидроксиламина + 1 мл водного раствора сернокислого марганца. Смесь в пробирке встряхивают и помещают в термостат при 37°C на 6 ч. После этого в нее добавляют 3,5 мл смеси 2,5 н раствор соляной кислоты и 15% трихлоруксусной кислоты в соотношении 1:3 и центрифугируют. К надосадочной жидкости добавляют 1 мл 5% раствора треххлорного железа.

Регистрацию результатов осуществляют через 30 мин после добавления треххлорного железа к надосадочной жидкости визуально по изменению окраски и с помощью фотоэлектроколориметрии. При положительной реакции на трансферазную активность бактерий отмечают появление желто-зеленоватой окраски и увеличение плотности раствора в опытной пробе при исследовании с помощью спектрофотометра.

*Применение:* используют для диагностики НР. Доступна для любых микробиологических лабораторий.

### **Определение редукции хлорида трифенил тетразолиума микроорганизмами**

*Принцип* — при взаимодействии редуктаз микробной культуры с раствором трифенил тетразолиума хлорида (ТТХ), приливаемым в питательную среду, происходит окислительно-восстановительная реакция с

восстановлением субстрата и образованием хромогенного соединения (в клетках) в виде формазана с изменением цвета смеси на розово-красный.

*Реагенты и материалы.*

Микробная культура на плотных питательных средах, 1% раствор ТТХ на дистиллированной воде, рН 7,2–7,4. Пробирки, пипетки, чашки Петри и др. лабораторное оборудование.

*Техника постановки реакции.*

С чашек делают смыв микробной культуры на 0,9% растворе хлорида натрия концентрацией 10–20 млрд клеток в 1 мл и более. Затем к 0,25 мл микробной суспензии приливают равный объем 1% раствор ТТХ, встряхивают и наблюдают за изменением окраски раствора.

Регистрацию результатов осуществляют визуально в течение первых 5–10 мин до 20–30 мин по изменению цвета среды на розово-красный.

*Применение:* используют для диагностики инфекции НР. Доступна для любых микробиологических лабораторий.

**Определение пиридокарбиноламинадазы, L-аргининаминадазы и L-аспарагинаминадазы микроорганизмов**

*Принцип* — при взаимодействии бактериальной пиридокарбиноламинадазы с пиридокарбинолом, L-аргининаминадазы с аргинином или L-аспарагинаминадазы с аспарагом, содержащимся в питательном растворе, происходит дезаминирование субстрата с образованием аммиака, который выявляется с помощью реактива Несслера, вследствие чего среда приобретает оранжево-кирпичный цвет.

*Реагенты и материалы.*

Микробная культура на плотных питательных средах, аргинин или аспарат порошкообразный во флаконе, реактив Несслера, фосфатный буфер (1/15 моль, рН 7,4), дистиллированная вода, рН 7,4; пробирки, пипетки, аналитические весы и др. лабораторное оборудование.

Приготовление рабочего раствора аминокислоты. Навеску пиридокарбинола, аргинина или аспарата 66 мг вносят в пробирку с 10 мл дистиллированной воды, перемешивают и получают 0,66% раствор субстрата, который используют в работе.

*Техника постановки реакции.*

В 0,5 мл фосфатного буфера тщательно эмульгируют полную бактериальную петлю исследуемой культуры (питательную среду не захватывают). К полученной взвеси бактерий добавляют 0,5 мл рабочего раствора пиридокарбинола, аргинина или аспарата. В контрольную пробирку к взвеси бактерий в фосфатном буфере добавляют 0,5 мл дистиллированной воды. Опытные и контрольные пробирки инкубируют при 37°C в течение 30 мин, после чего в них вносят по 0,4 мл коммерческого реактива Несслера.

Регистрацию результатов осуществляют визуально по изменению цвета среды со светло-желтого в оранжево-кирпичный.

*Применение:* используют для диагностики НР. Доступна для любых микробиологических лабораторий.

### **Определение щелочной фосфатазы у микроорганизмов**

*Принцип* — при взаимодействии щелочной фосфатазы (ЩФ), продуцируемой микробной культурой в щелочной среде с паранитрофенилфосфатом бария, происходит расщепление субстрата с освобождением паранитрофенола и изменением цвета среды в желто-зеленый.

*Реагенты и материалы.*

Микробная культура на плотных питательных средах, аммиачный буфер pH 9,2–9,8; 0,5% раствор хлористого магния, 40% раствор едкого натрия, 0,8% раствор паранитрофенилфосфата бария (0,8 г паранитрофенилфосфата бария растворяют в 100 мл 0,001 н раствора соляной кислоты, мутный раствор фильтруют. Для удаления зеленоватого оттенка раствора фильтрат переносят в делительную воронку и взбалтывают с равным объемом серного эфира; обработку повторяют до получения бесцветного водного слоя, который выпускают из делительной воронки в темную склянку так, чтобы эфирный слой не попал в субстрат). Пробирки, пипетки, чашки Петри, делительная воронка и др. лабораторное оборудование.

*Техника постановки реакции.*

С чашек делают смыв микробной культуры на 0,9% растворе хлорида натрия концентрацией 50–100 млн клеток в 1 мл и более. Затем к 1,0 мл микробной суспензии приливают 0,5 мл раствора паранитрофенилфосфата бария, 2 капли аммиачного буфера и 2 капли 0,5% раствора хлористого магния, встряхивают, пробирку закрывают пробкой и помещают в водяную баню при 38°C на 60 мин, затем добавляют 1 каплю 40% раствора едкого натрия и центрифугируют при 1500–2000 об/мин в течение 10 мин. В полученной надосадочной жидкости наблюдают за изменением окраски раствора. В первую контрольную пробу добавляют вместо 0,5 мл раствора паранитрофенилфосфата бария — 0,5 мл дистиллированной воды, а во вторую контрольную пробу — вместо 1,0 мл микробной суспензии — 1,0 мл дистиллированной воды.

Регистрацию результатов осуществляют визуально путем сравнения зеленоватой окраски жидкости в опытной и контрольной пробах в компараторе с растворами стандартной шкалы.

*Применение:* используют для диагностики НР. Доступна для любых микробиологических лабораторий.

### **Определение продукции H<sub>2</sub>S у микроорганизмов**

*Принцип* — при культивировании микробов, образующих при ферментативном гидролизе субстрата сероводород, последний, соединяясь с уксусно-кислым свинцом, образует сульфид свинца, придающий среде черный цвет.

*Реагенты и материалы.*

Микробная культура на плотных питательных средах, питательный МПА в пробирке с pH 7,4–7,6; 10% водный раствор уксусно-кислого свинца, 20% водный раствор яичного белка. Пробирки, пипетки, чашки Петри, водяная баня и др. лабораторное оборудование.

Приготовление питательной среды с уксусно-кислым свинцом. Пробирку с 8 мл МПА помещают в водяную баню и доводят ее до кипения. После расплавления агара его охлаждают до 45–55°C и приливают 1 мл 10% раствора уксусно-кислого свинца и 1 мл 20% раствора яичного белка. Смесь сильно взбалтывают, разливают в пробирки по 5 мл столбиком и стерилизуют в аппарате Коха при 100°C три дня подряд по 30 мин.

*Техника постановки реакции.*

Метод 1. Исследуемую суточную микробную культуру забирают фламбированной петлей (или иглой), производят посев уколом в столбик питательного агара и пробирку с пробой помещают в термостат при 37–43°C.

Регистрацию результатов осуществляют через 4 ч и позднее после инкубации посевов в термостате. При положительной реакции отмечают выраженное почернение среды по линии укола в участке роста микробов. В отрицательных случаях, когда культура не образует сероводород, наблюдают серовато-беловатый рост по ходу укола.

Метод 2. Используют длинную пробирку с агаровой средой, содержащей 0,025% цитрата железа(III)-аммония или 0,015% сульфата железа (II). Среда должна содержать источник органической серы (обычно пептон), а также тиосульфат натрия (от 0,008 до 0,03%), так как некоторые бактерии могут образовывать H<sub>2</sub>S лишь из одного из этих источников серы. Образование сульфида обычно лучше всего происходит в анаэробных или полуанаэробных условиях, поэтому инокулируют столбики агара. Положительная реакция: почернение среды во время роста за счет образования сульфида железа .

Метод 3. Этот метод более чувствителен, чем метод 2. Фильтровальную бумагу разрезают на полоски 5x20 мм и погружают в раствор 5% ацетата свинца. Полоски стерилизуют в пробирках, закрытых ватными тампонами, и сушат в сушильном шкафу. Инокулируют пробирку с жидкой средой, содержащей источники серы (см. метод 2). Перед инкубацией в пробирку помещают бумажную полоску так, чтобы ее конец находился приблизительно на 1,3 см выше уровня среды; верхнюю часть полоски можно закрепить ватной или какой-либо другой пробкой. Полоска не должна соприкасаться со средой. Точно так же готовят и неинокулированные контрольные пробирки. Положительная реакция: почернение нижней части полоски после нескольких дней инкубации.

*Применение:* используют для диагностики НР. Доступна для любых микробиологических лабораторий.

### **Определение способности микроорганизмов расщеплять углеводы**

*Принцип* — при взаимодействии микробной культуры с раствором глюкозы и индикатором происходит ее разложение при жизнедеятельности микроорганизма с изменением цвета смеси на ярко-розовый.

*Реагенты и материалы.*

Микробная культура на плотных питательных средах, среда (1 г пептона и 0,5 г поваренной соли растворяют при нагревании 1–2 мин в 100 мл дистиллированной воды, фильтруют до прозрачного раствора, устанавливают рН 7,0–7,4 и затем добавляют 0,5–1,0 г глюкозы и 1 мл индикатора Андрее или 0,1 мл 1,6% раствора индикатора бромтимоловый синий); предметные и покровные стекла, чашки Петри, пробирки.

Индикатор Андрее (0,5 г кислого фуксина растворяют в 100 мл стерильной дистиллированной воды и прибавляют 16,4 мл нормального раствора едкого натра).

*Техника постановки реакции.*

В 1,0 мл полученной смеси тщательно эмульгируют полную бактериальную петлю исследуемой культуры и оставляют, наблюдая за изменением цвета смеси.

Регистрацию результатов осуществляют визуально по изменению цвета среды в первом случае с соломенно-желтого на ярко-розовый, а во втором — с болотно-зеленого на желтый.

**Образование газов из сахаров**

*Принцип* — при взаимодействии микробной культуры с раствором глюкозы происходит ее разложение при жизнедеятельности микроорганизма с образованием углекислого газа.

**Метод 1.** Перед автоклавированием бульона с углеводами в пробирку помещают вверх дном стеклянный поплавок (10 x 75 мм). После автоклавирования он полностью заполняется средой. В случае термолабильных сахаров после автоклавирования и остывания к основной среде с соблюдением правил асептики добавляют их концентрированные растворы, стерилизованные фильтрованием. Пробирки оставляют приблизительно на день для диффузии сахаров в перевернутые поплавки. Среду инокулируют и инкубируют. Положительный результат: накопление газа в поплавке. Примечание: если среду перед использованием хранят в холодильнике, а затем инокулируют и инкубируют, растворенные газы в среде могут высвободиться и накапливаться в поплавках, приводя к ложноположительной реакции. В качестве контроля используют стерильные пробы. Если клетки образуют очень небольшое количество двуокиси углерода, ее трудно обнаружить из-за высокой растворимости и быстрой диффузии в воздух. Такая проблема не возникает при применении методов 2 и 3.

**Метод 2.** Этот метод совпадает с методом 1 с той лишь разницей, что после инокуляции для предотвращения диффузии двуокиси углерода в воздух в пробирки добавляют 1 мл стерильного минерального (вазелинового) масла. Используют содержащую сахар агаровую среду, охлажденную после автоклавирования до 45°C (в случае термолабильных сахаров к основной агаровой среде, расплавленной и охлажденной до 45°C, добавляют концентрированный раствор сахара, стерилизованный фильтрованием). Пробирки инокулируют и позволяют агару затвердеть. Покрывают застывший слой слоем 2% агара толщиной 6 мм, не содержащего питательных веществ (т. е. агара, приготовленного на воде), а затем тонким слоем стерильного масла. Культуры инкубируют. Положительный результат: разрывы в среде и поднятие слоя агара.

*Применение:* используют для диагностики инфекции НР. Доступна для любых микробиологических лабораторий.

**Определение способности роста микроорганизмов на средах с различными добавками (сукцинат, ацетат, пропионат, малат, цитрат)**

*Принцип* — при культивировании микробов в среде, содержащей натриевую соль определенной кислоты (янтарной, уксусной, пропионовой, яблочной, лимонной) происходит смещение реакции среды в щелочную сторону до рН 7,6, вследствие чего среда приобретает правильно синюю окраску.



### *Реагенты и материалы.*

Микробная культура на плотных питательных средах, серно-кислого магния 0,2 г, фосфорнокислого натрия 1,5 г, одноосновного фосфорно-кислого калия 1 г, лимонно-кислого натрия (сукцината, ацетата, пропионата или малата натрия) кристаллического 3 г растворяют в 1 л дистиллированной воды. Смесь стерилизуют в автоклаве. Прибавляют 20 г агар-агара, нагревают до его расплавления, устанавливают pH 7,2 и затем прибавляют 1 мл 1,5% спиртового раствора бромтимолового синего. Среду фильтруют через вату, разливают в пробирки, автоклавируют 15 мин при 120° и скашивают.

### *Техника постановки реакции.*

В полученной смеси тщательно эмульгируют полную бактериальную петлю исследуемой культуры и оставляют, наблюдая за изменением цвета смеси.

Регистрацию результатов осуществляют визуально по изменению цвета среды с травянисто-зеленого цвета на синий.

*Применение:* используют для диагностики НР. Доступна для любых микробиологических лабораторий.

### **Определение оксидазной активности микроорганизмов**

*Принцип* — при взаимодействии микробной культуры с раствором тетраметилпарафенилендиамина происходит его разложение под влиянием оксидазы бактерий с изменением цвета смеси на красный.

Нельзя проводить тест на оксидазу на средах, содержащих кровь, так как кровь, если ее не прогреть, обладает оксидазной активностью.

### *Реагенты и материалы.*

Микробная культура на плотных питательных средах, тетраметилпарафенилендиамин; предметные и покровные стекла, чашки Петри, пробирки.

### *Техника постановки реакции.*

Метод 1. Материал культуры, захваченный запаянной пипеткой Пастера, эмульгируют на поверхности предметного стекла в 1 капле свежеприготовленного 1% водного раствора тетраметилпарафенилендиамина и оставляют, наблюдая за изменением цвета смеси.

Регистрацию результатов осуществляют визуально по изменению цвета среды на красный спустя 3–5 с.

Метод 2. Этот метод менее чувствителен, чем метод 1, но он более удобен. Несколько капель смеси (1:1 по объему)

1% α-нафтола, растворенного в 95% этаноле, и свежеприготовленного 1% водного раствора оксалата диметил-*n*-фенилендиамина (Qifco Laboratories) наносят на колонии в чашках с агаром. В другом варианте к жидкой культуре добавляют 0,2 мл α-нафтола и 0,3 мл диметил-*n*-фенилендиамина и энергично перемешивают. Положительная реакция: окрашивание колоний или бульонной культуры в фиолетово-синий цвет в течение 10 – 30 с.

Метод 3. На отрезок фильтровальной бумаги наносит несколько капель 1% раствора дигидрохлорида тетраметил-*n*-фенилендиамина (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo.), приготовленного в тот же день. Выросшую

культуру снимают с поверхности агаровой среды платиновой петлей (обычные петли из нихромовой проволоки могут давать ложноположительную реакцию) и наносят ее на увлажненную бумагу. Положительная реакция: развитие фиолетовой или пурпурной окраски в течение 10 с.

*Применение:* используют с целью диагностики инфекции НР, является одним из основных факторов патогенности данного микроорганизма.

### **Определение каталазной активности микроорганизмов**

*Принцип* — при взаимодействии микробной культуры с раствором перекиси водорода происходит ее разложение под влиянием каталазы бактерий с образованием пузырьков газа ( $O_2$ ) в культуре.

При проверке анаэробных микроорганизмов на каталазную активность следует выдержать культуру на воздухе в течение примерно 30 мин, а затем добавить перекись водорода.

Нельзя проводить тест на каталазу на средах, содержащих кровь, так как кровь, если ее не прогреть, обладает каталазной активностью.

*Реагенты и материалы.*

Микробная культура на жидких или плотных питательных средах, 3–3,5% раствор перекиси водорода; предметные и покровные стекла, чашки Петри, пробирки.

*Техника постановки реакции.*

Метод 1. Методика открытой капли на предметном стекле: на предметное стекло наносят каплю микробной культуры, добавляют 1 каплю 3–3,5% раствора перекиси водорода и оставляют, наблюдая за появлением пузырьков газообразного  $O_2$ .

Метод 2. Этот метод устраняет проблему впитывания, которая может возникать при добавлении перекиси водорода в колонии, растущие в чашках или на косяках. Выросшую культуру снимают с поверхности агара неметаллическим инструментом и суспендируют в капле 3% перекиси водорода на предметном стекле. Немедленно и через 5 мин наблюдают за образованием пузырьков визуально или в микроскоп с малым увеличением.

Метод 3. Метод применяется для определенных бактерий, способных образовывать каталазу только при росте на среде, содержащей гем. К стерильной основе кровяного агара, содержащей 1% глюкозы для ингибирования образования псевдокаталазы, добавляют 5% (по объему) смеси дефибринированной крови и стерильной воды (1:1). Среду нагревают при 100°C в течение 15 мин для инактивации каталазы крови, охлаждают до 45 – 50°C и разливают по чашкам. Рост проверяют непосредственно в чашках с помощью 3% перекиси водорода или по методу 2.

Регистрацию результатов осуществляют визуально или в микроскоп с небольшим увеличением по феномену образования пузырьков газа.

*Применение:* применяют для диагностики НР, является одним из факторов патогенности микроорганизма. Доступна для любых микробиологических лабораторий.

**Применение бактериологического метода:** используют для определения чувствительности штамма *HP* у данного больного к антибактериальным средствам.

### **Уреазный тест**

Данный тест является вариантом идентификационного теста для *HP*, только реакция оценивается сразу в биоптате слизистой или осадке желудочного содержимого, без выращивания бактерии в культуре.

Тест основан на обнаружении уреазы, которую продуцируют бактерии в большом количестве. Продукция уреазы *HP* приводит к её накоплению в ткани желудка. Это дает возможность использовать методы обнаружения уреазы непосредственно в биоптатах слизистой. К настоящему времени предложено много различных тестов для обнаружения уреазы в слизистой оболочке желудка. В основе всех биохимических тестов лежит один и тот же принцип. При гидролизе мочевины под действием уреазы образующийся ион аммония приводит к сильному увеличению pH среды. Это фиксируется с помощью индикатора (феноловый красный), а также визуально, по изменению окрашивания среды (феноловый красный имеет желтый цвет при pH 6,8, и ярко-малиновый при pH 8,4). По изменению окраски реактива определяется уреазная активность биоптата. Высокочувствительными и специфичными являются методы, определяющие только тканевую, не бактериальную, уреазу. Это так называемые «холодные» методы, работающие при комнатной температуре, содержащие бактерицидные добавки, уничтожающие любую микрофлору в биоптате. Специфичность данных методов составляет 100%, чувствительность — 99–95%.

Некоторые авторы предлагают использовать для определения уреазной активности желудочное содержимое. Связано это с тем, что фермент уреазы накапливается не только в ткани желудка, но и в желудочном содержимом, на клетках покровного эпителия, в результате их постоянной десквамации в просвет желудка. Наиболее информативным из визуальных методов является способ определения уреазной активности в осадке тощачовой порции желудочного содержимого, основанный на доведении pH среды осадка до 6,75 буфером с последующим центрифугированием и проведением уреазного теста. Специфичность данного метода составляет 83%, чувствительность — 94%.

В основу всех идентификационных тестов легли химические закономерности используемые в ферментативных реакциях. Так идеальная концентрация субстрата должна быть в 50–100 раз больше  $K_m$  фермента (константа определяет сродство фермента к субстрату). Это связано с тем, что при избытке субстрата скорость реакции зависит только от активности данного фермента.  $K_m$  уреазы имеет значение 0,32 г/л (8 ммоль). Следовательно, идеальная концентрация мочевины в тесте должна составлять 16–32 г/л. Выше этого значения происходит подавление активности фермента. В качестве индикатора был использован феноловый красный, который имеет желтый цвет при pH 6,8. Выше этого значения происходит покраснение раствора и он становится ярко-малиновым при pH 8,4. Кроме этого, для уменьшения ложноположительных результатов теста в состав последнего, в качестве бактерицидной добавки, обычно входит азид натрия в конечной концентрации 0,2 г/л.

Сравнительная характеристика различных уреазных методов диагностики (тестов) представлена в таблице (табл. 2).

**Сравнительная характеристика различных  
уреазных методов диагностики**

<b>Название теста</b>	<b>Чувствительность (%)</b>	<b>Специфичность (%)</b>
Среда Христенсена	92	99,4
4 ч быстрый уреазный тест	89	100
1-минутный тест	90	100
CLO-тест	99	100
Самру-тест	98	100
Jatrox-H.p.-тест	95	99

*Определение уреазной активности в биоптате слизистой.*

*Постановка и оценка реакции.*

Для определения уреазной активности в биоптатах слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки, десневых карманах чаще используют жидкую среду Христенсена, приготовленную самостоятельно (см. биологический метод диагностики НР: определение уреазной активности микроорганизмов) или стандартные наборы для быстрого уреазного теста. При использовании жидкой среды Христенсена постановка и оценка реакции ничем не отличается от определения уреазной активности в чистой культуре, только вместо культуры НР используют биоптат слизистой.

В качестве примера стандартного набора для быстрого уреазного теста приведем набор Jatrox-H.p.-Test (Rohm Pharma, Германия). В состав одного набора входят 20 таблеток для теста (1 таблетка содержит 97,72% мочевины и 0,017% фенолового красного), 20 пробирок типа «Eppendorf» для реакции объемом 1,0 мл и 1 сосуд с дистиллированной водой объемом 20 мл. В 0,5 мл дистиллированной воды, которую переносят в пробирку, растворяют 1 таблетку для теста и тщательно закрывают крышкой. Раствор годный для использования имеет светло-желтую окраску. При покраснении раствора тест непригоден для использования.

Биоптат слизистой, полученный при эндоскопическом исследовании (прицельная биопсия), помещают в пробирку с раствором. Покраснение среды указывает на присутствие НР. В большинстве случаев покраснение среды у пациентов с НР-инфекцией происходит в течение 30 мин (положительная реакция). Если покраснение среды произошло после 30 мин, то реакция считается слабоположительной, а после 24 ч — отрицательной.

*Определение уреазной активности в осадке желудочного содержимого.*

Для определения уреазной активности используют осадок тощаковой порции желудочного содержимого, рН среды 6,75, концентрацию в конечном растворе мочевины 33 г/л, фенол-рот 0,133 г/л.

### *Постановка и оценка реакции.*

Порцию желудочного сока, полученную натошак при эндоскопическом исследовании, центрифугируют при 1,5–2 тыс. об/мин в течение 10 мин. Надосадок удаляют автоматической пипеткой объемом 1,0 мл. Осадок отмывают 10-кратным объемом 0,01М фосфатного буфера рН 6,75, центрифугируют при 1,5–2 тыс. об/мин в течение 10 мин. Надосадок удаляют автоматической пипеткой объемом 1,0 мл. К 1 объему осадка добавляют 2 объема идентификационного теста и инкубируют при комнатной температуре в течение 2–24 ч. В качестве контроля используют 1 объем 0,01 моль фосфатного буфера рН 6,75 и 2 объема идентификационного теста.

Оценку реакции проводят по изменению окраски раствора с желтого цвета на ярко-малиновый после инкубации при комнатной температуре в течение 2 ч (положительная реакция) и 24 ч (слабоположительная реакция). Уреазный тест считают негативным, если изменение окраски раствора как в опыте, так и в контроле произойдет после 24 ч инкубации при комнатной температуре.

*Приготовление идентификационного теста.* 5,0 г мочевины и 0,02 г азиды натрия развести в 90 мл 0,4 моль фосфатного буфера рН 6,75 (раствор № 1). Отдельно 0,02 г фенолового красного развести в 10 мл бидистиллированной воды (раствор № 2). 90 мл раствора № 1 смешать с 10 мл раствора № 2. Полученный раствор должен иметь желтоватый цвет. Идентификационный тест хранить в холодильнике при температуре +4°C в течение 1–2 мес. и при температуре -20°C в течение 6 мес. При покраснении раствора тест непригоден для использования.

**Применение уреазного теста:** используют при серийном эндоскопическом контроле и определении НР (например, на фоне пролонгированного лечения язвенной болезни или эрозивного процесса).

### **Дыхательный тест**

Радионуклидные методы диагностики НР основаны на прямом или косвенном определении уреазной активности НР. В этих методах используется мочевины, меченная изотопами углерода  $^{14}\text{C}$  или  $^{13}\text{C}$  и их концентрация определяется в выдыхаемом человеком  $\text{CO}_2$  (так называемый дыхательный тест). Каждый из этих методов имеет свои особенности, преимущества и недостатки, которые будут рассмотрены ниже.

*Дыхательный тест с использованием мочевины с изотопом  $^{14}\text{C}$ .*

### *Постановка и оценка реакции.*

Утром натошак обследуемый получает пробный завтрак и сразу после него 20 мл водного раствора мочевины меченной  $^{14}\text{C}$  (10 мкКюри). После этого больной поворачивается на один бок, затем на другой, для того, чтобы меченная мочевины хорошо распределилась по желудку. Спустя 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 и 120 мин после приема меченной мочевины больного просят выдыхать воздух через трубочку с обезвоженным хлоридом кальция в сосуд, содержащий 2 ммоль хиамин (вещества, связывающего  $\text{CO}_2$ ) в 2 мл спиртового раствора фенолфталеина. Обесцвечивание раствора свидетельствует о том, что он связал 2 ммоль  $\text{CO}_2$  из выдыхаемого больным воздуха. Затем к нему добавляется 10 мл сцинтиллята, содержащего толуен. Активность  $^{14}\text{C}$  измеряется жидкостным сцинтиллятором. В каждой пробе вычисляют процент содержания изотопа на ммоль  $\text{CO}_2$  и умножают на массу тела больного для учета эндогенной продукции последнего. Так как пиковая активность изотопа обычно

фиксируется на 40–60 мин исследования, то для диагностики НР можно измерять активность изотопа только в одной пробе, например на 40 или 60 мин. Такой вариант метода называется «упрощенным». Перед использованием «упрощенного» варианта дыхательного теста необходимо несколько раз выполнить его в «классической» форме для построения собственных кривых, поскольку компоненты, используемые в опыте могут быть разного качества и абсолютные показатели активности изотопа могут не совпадать с имеющимися в литературе. Чувствительность «упрощенного» метода составляет 95%, а специфичность 98%.

*Преимущества метода.* Так как  $^{14}\text{C}$  является радиоактивным изотопом, то его наличие определяют с помощью сцинтиллятора, стоимость которого гораздо дешевле стоимости высокочувствительного газового масс-спектрометра.

*Недостатки метода.* Не может использоваться у детей и беременных женщин ввиду его радиоактивности.

*Дыхательный тест с использованием мочевины с изотопом  $^{13}\text{C}$ .*

*Постановка и оценка реакции*

Для определения  $^{13}\text{C}$ , который не обладает радиоактивностью, требуется высокочувствительный газовый масс-спектрометр. Точность масс-спектрометра должна быть очень высокой. Он должен улавливать 0,03%  $^{13}\text{C}$  в выдыхаемом воздухе. Это соответствует 0,0005 мкмоль/кг/мин базальной продукции  $^{13}\text{C}$  в выдыхаемом человеком воздухе, которая в течение суток меняется в зависимости от употребления различных продуктов (злаки, тростниковый сахар), которые содержат углеводы, богатые этим изотопом. Для стабилизации базальной продукции изотопа исследование назначают натощак с применением специальных пробных завтраков. Компоненты, входящие в их состав, замедляют эвакуацию  $^{13}\text{C}$  из желудка и не позволяют попасть изотопу в толстую кишку. С этой целью для взрослых используют пудинг специального состава или 120 мл воды содержащей 25% полимера глюкозы, для детей — порцию мороженого. После этого обследуемый принимает раствор, содержащий 250 мг  $^{13}\text{C}$ , в концентрации 99–100%. Затем через 20, 30, 40, 50 мин производят забор проб выдыхаемого воздуха, в которых с помощью масс-спектрометра определяют содержание изотопа. Общая продукция  $\text{CO}_2$  определяется исходя из площади поверхности тела испытуемого по известным формулам. Полученный показатель используют при вычислении процентного содержания изотопа в выдыхаемом  $\text{CO}_2$ . В конечном итоге получают показатель уреазной активности непосредственно в цифровом виде (количество мкмоль мочевины, распадающейся в минуту).

*Преимущества метода.* Метод с определением  $^{13}\text{C}$  может применяться у всех, так как он абсолютно безопасен ( $^{13}\text{C}$  не обладает радиоактивностью).

*Недостатки метода.* Использование масс-спектрометра в наших условиях чрезвычайно дорого (около 250 000 долларов США).

**Применение дыхательного теста:** используют при длительном наблюдении за больными после успешного лечения, скрининга больных с диспептическим синдромом, а также у детей.

## Серологический метод диагностики НР

При инфицировании НР желудка и ДПК, в слизистой оболочке желудка и метаплазированной слизистой луковицы ДПК продуцируются антитела к антигенам, покрывающим клеточную стенку и жгутики бактерий. В подавляющем большинстве случаев эти антитела (преимущественно IgG типа) можно обнаружить в сыворотке крови различными методами. Таким образом, системный гуморальный иммунный ответ на НР является непрямым диагностическим указателем инфекции. Специфический системный гуморальный иммунный ответ является точным указателем наличия или отсутствия НР на слизистых оболочках с желудочным эпителием, хотя для его развития требуется длительное время. Так, антитела в сыворотке крови появляются через 2–3 недели после инфицирования, и, примерно через такое же время, титр антител начинает снижаться после успешного антигеликобактерного лечения. По мнению ряда авторов, наиболее точным и достоверным показателем эрадикации НР следует считать снижение уровня сывороточных антигеликобактерных IgG на 40–50% и более через 3–6 мес. после лечения. В настоящее время из различных иммунологических методов обнаружения антител к НР (гемагглютинация, реакция связывания комплемента, иммунофлюоресценция, вестерн блоттинг, иммуноферментный анализ) наиболее интенсивно используется метод иммуноферментного анализа (ИФА или ELISA). Сегодня он является наиболее предпочтительным из методов иммунологической диагностики. Чувствительность этого метода в среднем составляет 90–95%, специфичность — 80–90%. Обычно используются стандартные импортные наборы для определения НР методом иммуноферментного анализа (в английской аббревиатуре Enzyme-Linked Immunosorbent Assay; ELISA; табл. 3).

### *Постановка и оценка реакции.*

Для определения антител к антигенам НР чаще используют непрямо конкурентный ИФА. Он состоит из 4 стадий: 1) связывание антигена с твердой фазой (обычно используется специальный планшет для ИФА) и удаление избытка антигена; 2) инкубация с пробой содержащей антитела (чаще используется сыворотка крови больного) и удаление избытка антител; 3) инкубация с античеловеческими антителами (обычно IgG или IgA) мечеными каким-либо ферментом (чаще используется пероксидаза) и удаление избытка антител; 4) добавление в плашку субстрата для ферментативной реакции, продукты которой окрашивают раствор. Интенсивность окраски раствора прямо пропорционально количеству связанных антител. Время необходимое для полного исследования составляет около 2 ч. В состав промышленных наборов входит планшет с сорбированным и отмытым антигеном и набор реагентов для проведения ИФА. Процесс начинается со 2 стадии. Особенности постановки подробно изложены в инструкции, прилагаемой к каждому набору. Чувствительность и специфичность ИФА зависит в большой степени от характеристик антигена, к которому определяются антитела. Данные по чувствительности и специфичности ИФА наборов, выпускаемых различными фирмами приведены в таблице 3.

**Сравнительная характеристика коммерческих  
иммуноферментных (ELISA) наборов,  
выпускаемых различными фирмами**

Название набора	Фирма	Чувствительность (%)	Специфичность (%)
Cobas Core	Roche	93–99	77–97
Malakit	Biolab	87–96	79–96
Pylori Stat	Bio-Whittaker	90–99	70–98
HM-CAP	Enteric Products	95–98	92–98
Premier HP	Osi	87–93	81–96
Pyloriset	Orion (new)	93–100	79–85
HP IgG ELISA	DAI	95–100	80–96

В качестве примера приведем набор *HP IgG ELISA* для определения антител класса IgG к антигенам HP фирмы Diagnostic Automation, Inc. (США) по стандартной методике. После постановки ИФА (см. выше описание) необходимо определить калибровочный уровень (среднее значение трех калибровочных образцов, т.е. стандартных человеческих сывороток, умножают на корректирующий фактор, указанный на образцах). Расчет уровня IgG антител к HP производился путем деления единиц оптической плотности (ЕОП) образца каждого пациента на калибровочный уровень. Результат считается положительным (наличие IgG антител к *H. pylori* в сыворотке крови или выделенной фракции IgG) при расчетном уровне  $\geq 1,1$ , сомнительным — от 0,91 до 1,09 и отрицательным —  $\leq 0,9$ .

**Применение серологического метода диагностики HP:** используют для проведения эпидемиологических исследований, при длительном (несколько лет) наблюдении за больными после успешного лечения, скрининга больных с диспептическим синдромом.

**Дифференцированный подход к применению различных методов диагностики HP**

Для выявления HP в общей популяции населения используют эпидемиологические или скрининговые методы диагностики HP. К последним относится серологический метод. Он является неинвазивным методом диагностики и позволяет косвенно выявлять в организме человека HP и его токсигенные штаммы по наличию в сыворотке крови IgG и IgA антител к антигенам HP, в том числе к CagA и VacA антигенам. У детей для этих целей лучше использовать дыхательный тест с мочевиной меченной  $^{13}\text{C}$ .

Из пациентов, у которых HP обнаружен серологическим методом или дыхательным тестом, необходимо отобрать лица, которым необходимо провести эрадикацию HP. Абсолютные показания к лечению инфекции



НР (согласно рекомендациям Европейской (Маастрихт, 1996) и Российской (Москва, 1997) группы по изучению *H. pylori*) следующие: 1. Язвенная болезнь желудка и ДПК в стадии обострения и в стадии ремиссии. 2. Язвенное кровотечение и ушитая перфоративная язва как осложнение язвенной болезни. 3. Гастродуоденит с выраженными изменениями слизистой оболочки. 4. Состояние после резекции желудка по поводу рака. При отсутствии в анамнезе пептической язвы и наличии диспептического синдрома этим лицам необходимо провести эндоскопическое обследование желудка и двенадцатиперстной кишки. При эндоскопическом исследовании производится прицельная биопсия и диагностика НР морфологическим методом или быстрым уреазным тестом. Лечение назначают при наличии абсолютных показаний выявленных при сборе анамнеза или эндоскопическим методом. Через 4–6 недель после проведения курса антигеликобактерной терапии эрадикация НР подтверждается минимум 2 методами (обычно используют морфологический метод, быстрый уреазный или дыхательный тест). Скрининговые методы в этом случае не применяют. При отсутствии эрадикации НР после проведения 2 различных схем антигеликобактерной терапии используют бактериологический метод с определением чувствительности бактерии к антибактериальным препаратам и подбором оптимальной схемы лечения. Если при первичной диагностике НР не обнаруживается прямыми методами при наличии антител к НР в сыворотке крови, то необходимо применить более чувствительный метод ПЦР, используя биоптат слизистой. Методы диагностики НР в желудочном содержимом используются в настоящее время преимущественно в научных исследованиях. Уреазный тест с использованием биоптатов слизистой десневых карманов применяется для выявления постоянных носителей *HP*.