



УКРАЇНА

(19) UA (11) 42200 (13) A

(51) 7 G01N1/28, G01N1/30

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ
І НАУКИ УКРАЇНИДЕРЖАВНИЙ ДЕПАРТАМЕНТ
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІОПИС
ДО ДЕКЛАРАЦІЙНОГО ПАТЕНТУ
НА ВИНАХІДвидається під
відповідальність
власника
патенту(54) СПОСІБ ДІАГНОСТИКИ ІНФЕКЦІЇ ШЛУНКОВО-КИШКОВОГО ТРАКТУ, ВИКЛИКАНОЇ *HELICOBACTER PYLORI*

(21) 2000106121

(22) 31 10 2000

(24) 15 10 2001

(33) UA

(46) 15 10 2001, Бюл. № 9, 2001 р.

(72) Вільцанюк Олександр Афанасійович, Медвецький Євгеній Болеславович, Геращенко Ігор Іванович, Деев Валерій Аркадійович, Вільцанюк Ірина Олександрівна

(73) Вільцанюк Олександр Афанасійович, UA, Медвецький Євгеній Болеславович, UA, Геращенко Ігор Іванович, UA, Деев Валерій Аркадійович, UA, Вільцанюк Ірина Олександрівна, UA

(57) 1 Спосіб діагностики інфекції шлунково-кишкового тракту, викликаной *Helicobacter pylori*, який включає фіксацію біоптату слизової оболонки шлунку або кишечника в 1-1,5 мас % розчині фосфорновольфрамової кислоти, забарвлення над від-

критим вогнем сумішшю, до складу якої входять, мас %

азур II 0,8-1,5

гліцерин 30-40

вода решта,

з подальшою мікроскопією, який відрізняється тим, що додатково включає вміщення другого біоптату в рідке середовище, яке містить, мас %

сечовина 2-4

індикатор 0,00125-0,0025

вода решта,

з візуальним спостереженням за зміною забарвлення середовища в часі

2 Спосіб за п. 1, який відрізняється тим, що як індикатор використовують феноловий червоний, метантрофенол або інші індикатори, рН переходу забарвлення яких знаходиться в інтервалі 6,8-8,4

Винахід відноситься до медицини, а саме, до діагностичних тестів, що застосовують в гастроентерології для експрес-виявлення мікроорганізмів *Helicobacter pylori* (Hr) в біоптатах слизової оболонки шлунково-кишкового тракту (ШКТ)

Відомо декілька методів діагностики інфекції органів травлення, викликаной *Helicobacter pylori*. Ці методи засновані на безпосередньому виявленні мікроорганізму або продуктів його життєдіяльності в організмі хворого. Як аналог можна навести біохімічний уреазний тест - визначення уреазної активності в біоптаті слизової оболонки шлунка шляхом вміщення його в рідке середовище, яке містить сечовину, буфер і індикатор [1]. Цей тест відрізняється простотою і швидкістю виконання, але іноді він через різну ферментативну активність бактерій дає як хибнонегативні так і хибнопозитивні результати, що знижує достовірність діагнозу.

Найбільш близьким за технічною суттю до запропонованого способу є бактеріоскопічний спосіб виявлення Hr в біоптатах слизової оболонки ШКТ, який включає фіксацію препарату в 1-1,5 мас % розчині фосфорновольфрамової кислоти, забарвлення над відкритим вогнем сумішшю, до складу якої входять, мас %

азур II 0,8-1,5

гліцерин 30-40

вода решта,

з подальшою мікроскопією [2]. Перевагою цього експрес-методу є можливість оцінювати ступінь мікробної забрудненості слизової оболонки, але в окремих випадках тест дає хибнонегативні результати.

В основу винаходу покладено завдання розробити такий спосіб діагностики інфекції ШКТ, викликаной Hr, в якому завдяки поєднанню уреазного і бактеріоскопічного тестів забезпечувалась би висока швидкість виконання аналізу і можливість оцінювати ступінь мікробної забрудненості слизової оболонки і тим самим підвищувалась ефективність і достовірність діагностики.

Розв'язання вказаного завдання досягається тим, що в спосіб діагностики інфекції шлунково-кишкового тракту, викликаной *Helicobacter pylori*, який включає фіксацію біоптату слизової оболонки шлунку або кишечника в 1-1,5 мас % розчині фосфорновольфрамової кислоти, забарвлення над відкритим вогнем сумішшю, до складу якої входять, мас %

азур II 0,8-1,5

гліцерин 30-40

вода решта,

(19) UA (11) 42200 (13) A

з подальшою мікроскопією, згідно з винаходом, додатково включають вміщення другого біоптату в рідке середовище, яке містить, мас %

| | |
|-----------|----------------|
| сечовину | 2-4 |
| індикатор | 0,00125-0,0025 |
| воду | решта, |

з візуальним спостереженням за зміною забарвлення середовища в часі

Винахідницький рівень запропонованого рішення полягає в тому, що при приготуванні середовища для постановки уреазного тесту замість 0,01 М фосфатного буфера беруть воду, тобто склад середовища стає менш складним, а процедура його приготування спрощується. Нами доведено, що використання буферного розчину у порівнянні з водою не надає суттєвих переваг – точність аналізу не підвищується, а в окремих випадках час переходу забарвлення середовища навіть стає тривалішим (табл. 1). Як індикатор можна використовувати феноловий червоний, метантрофенол або інші індикатори, рН переходу забарвлення яких знаходиться в інтервалі 6,8-8,4.

Спосіб виконують наступним чином. Під час ендоскопії беруть два біоптата слизової оболонки шлунку або кишечника. Перший біоптат вміщують у флакон із середовищем для постановки уреазного тесту, яке містить сечовину (2-4 мас %), індикатор (0,00125-0,0025 мас %) і воду (решта) (табл. 3). Починають відлік часу, спостерігаючи за зміною кольору середовища. Залежність якості і швидкості переходу забарвлення від концентрації сечовини і фенолового червоного показані в табл. 2.

При цьому, інкубаційне середовище готують наступним чином.

В ступці перетирають 4 г сечовини і 2,5 мг фенолового червоного, доки не утвориться однорідна за кольором суміш. Одержану суміш розважують по 0,020 г у скляні флакони місткістю 10-15 мл, наприклад, у флакони з під пеніциліну, закривають гумовими пробками і закатують алюмінієвими ковпачками. В такому вигляді діагностикум може зберігатися не менше 2 років. Для приготування середовища флакон відкривають, додають 0,5-1,0 мл дистильованої води і розчиняють суміш.

Паралельно з другого біоптату роблять відбиток на чистому предметному склі. Висушують. На препарат наливають 1-1,5 мас % розчин фосфорновольфрамової кислоти, через 5-7 хвилин зливають, промивають водою. Покривають препарат сумішшю, яка містить, мас %

| | |
|----------|---------|
| азур II | 0,8-1,5 |
| гліцерин | 30-40 |
| вода | решта |

Проводять склом 15-20 разів над вогнем газового або спиртового пальника, доки не з'явиться пара. Охолоджують скло протягом 1 хвилини. Обережно, тримаючи скло у горизонтальному положенні, поливають водою, змиваючи барвник. Препарат висушують і розглядають під мікроскопом. При цьому, суміш для забарвлення готують наступним чином. В 60 мл дистильованої води розчиняють азур II до повного розчинення, додають гліцерин, доводять об'єм водою до 100 мл.

Для доведення можливості досягнення позитивного ефекту було досліджено біопсійний матеріал ШКТ у 120 хворих запропонованим способом.

Результати визначення оптимального складу фарбуючого розчину показані в табл. 3.

Приклад 1. Під час ендоскопії взяли два біоптата слизової оболонки антрального відділу шлунка. Перший біоптат внесли в флакон із середовищем для постановки уреазного тесту, яке містить, мас %

| | |
|--------------------|---------|
| сечовина | 2 |
| феноловий червоний | 0,00125 |
| вода | решта |

Почали відлік часу, спостерігаючи за зміною кольору середовища. Час кінця переходу соломяно-жовтого забарвлення у малинове склав 4 хвилини 10 секунд.

Паралельно з другого біоптату зробили відбиток на чистому предметному склі. Висушили. На препарат налипи 1,5% розчин фосфорновольфрамової кислоти, через 7 хвилин злили, промили водою. Покрили препарат сумішшю, яка містить, мас %

| | |
|----------|-------|
| азур II | 1,5 |
| гліцерин | 40 |
| вода | решта |

Проводять склом 20 разів над вогнем спиртового пальника, доки не з'явиться пара. Охолоджують скло протягом 1 хвилини. Обережно, тримаючи скло у горизонтальному положенні, поливали водою, змиваючи барвник. Препарат висушували і розглядали під мікроскопом, мікроорганізми. Нр виявляли в препараті у вигляді темно-синіх вигнутих паличок або спірил. Ступінь обсіменіння склав від 20 до 50 мікробних тіл в полі зору, що відповідає середньому ступеню мікробної забрудненості.

Приклад 2. Під час ендоскопії взяли два біоптата слизової оболонки з преульцерозної зони виразки 12-палої кишки. Перший біоптат внесли в флакон із середовищем для постановки уреазного тесту, яке містить, мас %

| | |
|-----------|--------|
| сечовина | 4 |
| індикатор | 0,0025 |
| вода | решта |

Почали відлік часу, спостерігаючи за зміною кольору середовища. Час кінця переходу соломяно-жовтого забарвлення у малинове склав 1 хвилину 20 секунд.

Паралельно, з другого біоптату зробили відбиток на чистому предметному склі. Висушили. На препарат налипи 1% розчин фосфорновольфрамової кислоти, через 5 хвилин злили, промили водою. Покрили препарат сумішшю, яка містить, мас %

| | |
|----------|-------|
| азур II | 1,5 |
| гліцерин | 40 |
| вода | решта |

Проводять склом 15 разів над вогнем газового пальника, доки не з'явиться пара. Охолоджують скло протягом 1 хвилини. Обережно, тримаючи скло у горизонтальному положенні, поливали водою, змиваючи барвник. Препарат висушували і вивчали під мікроскопом, мікроорганізми. Нр виявляли в препараті у вигляді темно-синіх паличкоподібних структур або спірил. Ступінь обсіменіння склав більше 50 мікробних тіл в полі зору, що відповідає високому ступеню мікробної забрудненості.

Для перевірки ефективності запропонованої методики досліджували біоптати слизової оболонки ШКТ у 120 хворих. Позитивний результат уреазного тесту був одержаний при дослідженні біоптатів, взятих у 103 хворих, що підтвердилося при мікроскопії мазків - відбитків за запропонованою методикою. Негативний результат уреазного тесту було зафіксовано у 17 осіб, але при використанні бактеріоскопічного методу у 2 осіб з негативними результатами уреазного тесту в мазках-відбитках була виявлена наявність *Нр*, яка становила до 20 мікробних тіл в полі зору, що відповідає низькому ступеню мікробної забрудненості. У 3 осіб позитивний результат уреазного тесту не підтвердився при бактеріоскопічному дослідженні.

Таким чином, запропонований спосіб з паралельним використанням біохімічного і бактеріоско-

пічного методів за розробленими методиками дозволяє виключити хибнонегативні і хибнопозитивні результати, що підвищує надійність діагностики інфекції ШКТ, викликані *Нр*.

Джерела інформації

1 Рекомендации по диагностике *Helicobacter pylori* у больных язвенной болезнью и методам их лечения // Рос журн гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии - 1998 - № 1 - С 105-107

2 Патент 1794245 АЗ (SU) Способ выявления *Camphylobacter pyloridis* в слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта / Е.Б. Медвецкий, Е.П. Тумасова, Э.В. Гершевицова. Опубл. 07.02.1993, Бюл. № 5 - 3 с.

Таблиця 1

Порівняльна характеристика часових інтервалів (в хвиликах) переходу забарвлення в уреазному тесті

| № обстеження | Середовище приготоване на 0,01 М фосфатному буфері | Середовище приготоване на воді |
|--------------|--|--------------------------------|
| 1 | 30-60 | 4,0-6,0 |
| 2 | 30-40 | 3,0-4,5 |
| 3 | 20-30 | 2,5-3,5 |
| 4 | негативн | негативн |
| 5 | 10-15 | 1,0-1,5 |
| 6 | 180-240 | 6,0-10,0 |
| 7 | 10-15 | 1,5-2,0 |

Таблиця 2

Залежність якості і швидкості переходу забарвлення від концентрації сечовини і фенолового червоного в середовищі

| № п/п | Концентрація інгредієнтів, мас % | | Інтервал переходу забарвлення у хвиликах | Якість забарвлення |
|-------|----------------------------------|--------------------|--|--|
| | Сечовина | Феноловий червоний | | |
| 1 | 1 | 0,00062 | 4,5-6,0 | Дуже слабе забарвлення |
| 2 | 2 | 0,00125 | 3,5-4,5 | Чіткий перехід забарвлення |
| 3 | 3 | 0,00187 | 3,0-4,0 | Чіткий перехід забарвлення |
| 4 | 4 | 0,00250 | 2,0-3,0 | Чіткий перехід забарвлення |
| 5 | 5 | 0,00312 | 2,0-3,0 | Занадто інтенсивне забарвлення, заважає точно встановити зміну кольору |

Таблиця 3

Залежність якості забарвлення від концентрації фосфорновольфрамової кислоти і азур II у фарбуючому розчині

| № | Концентрація розчину (мас %) | | Результат зображення під мікроскопом |
|---|------------------------------|-----------------------------|---|
| | азур-II | фосфорновольфрамова кислота | |
| 1 | 0,6 | 0,6 | Низький контраст |
| 2 | 0,7 | 0,7 | Помірний контраст |
| 3 | 0,8 | 1,0 | Нормальний контраст |
| 4 | 1,2 | 1,2 | Нормальний контраст |
| 5 | 1,5 | 1,5 | Нормальний контраст |
| 6 | 1,6 | 1,6 | Контраст підвищений, забарвлюється середовище навколо мікроорганізмів |
| 7 | 2,0 | 2,0 | Інтенсивне забарвлення середовища, заважає виявленню мікроорганізмів |

ДП "Український інститут промислової власності" (Укрпатент)
Україна, 01133, Київ-133, бульв. Лесі Українки, 26
(044) 295-81-42, 295-61-97

Підписано до друку _____ 2002 р. Формат 60х84 1/8
Обсяг _____ обл.-вид арк. Тираж 50 прим. Зам. _____

УкрІНТЕІ, 03680, Київ-39 МСП, вул. Горького, 180
(044) 268-25-22
