

## СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ДВУХ МЕТОДОВ ВЫЯВЛЕНИЯ *HELICOBACTER PYLORI* (ДЕ-НОЛ ТЕСТ И ИММУНОЦИТОХИМИЯ)

В.В. Красин, Р.Ш. Хасанов, Р.И. Гарифуллин, П.А. Максимов, А.П. Киясов

*Клинический онкоцентр (главрач — Р.Ш. Хасанов) МЗ РТ,  
Центральная научно-исследовательская лаборатория (зав. — доц. А.П. Киясов)  
Казанского государственного медицинского университета*

Со времен открытия австралийскими исследователями В. Marshall и Р. Warren микроорганизмов группы *Helicobacter pylori* (НР) доказана их ведущая роль в патогенезе гастрита, а также язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки [2, 4, 5]. Последнее обстоятельство послужило толчком для разработки методов диагностики, позволяющих быстро и с высокой долей достоверности выявлять НР. К таким методам по праву можно отнести следующие: 1) выявление бактерий в антральных биоптатах рутинными гистологическими методами [9]; 2) микробиологические методы культивирования микроорганизмов [6]; 3) иммуноферментный анализ, позволяющий обнаружить антитела IgG, IgA и IgM классов в сыворотке крови, а также секреторные IgG и IgM в слюне и содержимом желудка, образующиеся у всех больных, инфицированных НР [1, 4]; 4) де-нол тест (Yamanouchi), основанный на быстром гидролизе мочевины уреазой, вырабатываемой НР [8]; 5) иммуноцитохимический метод с применением моноклональных или поликлональных антител против НР [7].

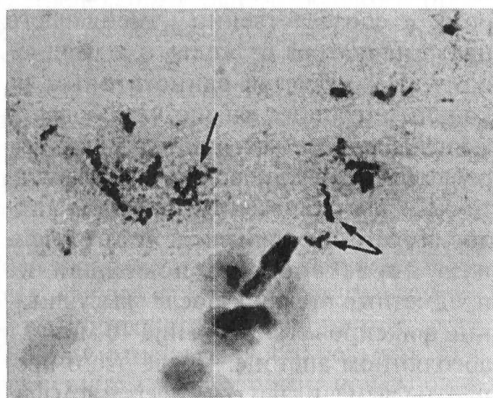
Для диагностики хеликобактериоза нами опробованы иммуноцитохимический метод и де-нол тест. Обследованы 20 пациентов: 11 больных раком желудка, 6 — язвой двенадцатиперстной кишки, 2 — язвой желудка и один — гастродуоденитом. Во время фиброгастроскопии у больного прицельно из участков с наиболее выраженными отклонениями от нормы (гиперемия, отек) брали биоптат слизистой оболочки желудка для проведения де-нол теста и соскоб со слизистой для иммуноцитохимического анализа. Полученные биоптаты помещали в пробирки с де-нол тестом. Под действием уреазы происходил гидролиз мочевины с образованием аммиака,

сдвигающего рН среды в щелочную сторону и соответственно изменяющего цвет индикатора от желтого к малиновому. НР является единственным из колонизирующих слизистую оболочку желудка видов бактерий, который вырабатывает уреазу в количествах, достаточных для разложения мочевины в условиях этого теста. Слизь же, полученную после соскоба, помещали на предметные стекла и после высушивания фиксировали в течение 10 минут в абсолютном ацетоне. После этого препараты вымачивали в забуференном физиологическом растворе (0,1 М трис-буфер, рН 7,4), инкубировали 20 минут с неиммунизированной сывороткой свиньи, а затем в течение 30 минут с кроличьими поликлональными антителами против НР. Препараты трижды отмывали в том же буферном растворе по 3 минуты и инкубировали 30 минут со вторичными антителами, меченными пероксидазой хрена. В качестве вторичных антител использовали конъюгированные с пероксидазой хрена иммуноглобулины свиньи против иммуноглобулинов кролика (Dako, разведение 1:100). Далее препараты отмывали так же, как и после обработки первичными антителами. В качестве субстрата пероксидазной реакции использовали раствор amino-этилкарбозола и перекиси водорода в ацетатном буфере (рН 5,0). Ядра подкрашивали гематоксилином, препараты заключали в глицерогель (Dako, Denmark). Контроль специфичности иммуноцитохимической реакции проводили путем замены первичных антител неиммунной сывороткой кролика.

При исследовании биоптатов, взятых у больных, цвет де-нол теста в разных случаях менялся в промежутках времени от 1 до 5 часов и более. В аннотации же, приложенной к тесту, было указано, что изменение цвета среды должно

происходить в течение 20 минут или максимум часа. В 18 случаях реакция оказалась положительной и в 2 случаях, когда цвет индикатора не изменился, — отрицательной.

Иммуноцитохимически НР-инфицирование было диагностировано у всех 20 обследованных нами пациентов. При микроскопии препаратов были видны красные спиралевидные и S-образные



Мазок со слизистой желудка, окрашенный антителами против *Helicobacter pylori*. Продукт иммуноцитохимической реакции локализован в бактериях (стрелки).  $\times 900$ .

бактерии (см. рис.), по количеству которых в полях зрения можно оценивать степень обсемененности слизистой оболочки желудка НР. На основании изложенного реакция де-нол теста в упомянутых выше 2 случаях была расценена как ложноотрицательная. Мы предполагаем, что ложноотрицательная реакция может быть следствием использования пациентом для лечения лекарственных препаратов, способных видоизменить статус НР (антибиотики, антимикробные средства, препараты висмута), а также по причине небольшого количества бактерий на единице площади слизистой оболочки желудка.

Для диагностики НР оптимально применение иммуноцитохимического метода, поскольку он имеет ряд преимуществ. Во-первых, для проведения исследования необходим лишь соскоб со слизистой оболочки желудка, что менее травматично, чем бранш-биопсия. Во-вторых, возможна количественная оценка инфицированности НР, что немаловажно в выборе адекватных доз препаратов при последующем лечении хеликобактериоза. В-третьих, требуется

стабильное и сравнительно небольшое время приготовления иммуноцитохимического препарата (около 2 часов); в-четвертых, этот метод обладает 100%-й чувствительностью.

Возможность хранения препаратов, в свою очередь, позволит изучать динамику процессов лечения и рецидивирования хеликобактериоза.

*Авторы выражают глубокую признательность за техническую и методическую помощь в проведении лабораторных исследований С.Г. Галямовой и А.А. Гумеровой.*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Lizza F., Maletta M.// Am. J. Gastroent. — 1995. — Vol. 90 (10). — P. 1820—1823.
2. Marshall B., Armstrong J. et al.// Med. J. Aust. — 1985. — Vol. 142 (8). — P. 436—439.
3. Marshall B., Warren J. et al.// Amer. J. Gastroent. — 1987. — Vol. 82 (3). — P. 200—210.
4. Matsucura N., Onda M. et al.//Cancer. — 1995. — Vol. 75 (6). — P. 1472—1477.
5. McNulty C., Gearty J. et al.// Brit. Med. J. — 1986. — Vol. 293. — P. 645—649.
6. Pincard K., Harrison B.// J. Clin. Pathol. — 1986. — Vol. 39 (1). — P. 112—113.
7. Tsutsumi Y.// Acta Histochem. et Cytochem. — 1996. — Vol. 29. — P. 94—96.
8. Vaira D., Holton I. et al.// J. Clin. Pathol. — 1988. — Vol. 41 (7). — P. 812—813.
9. Walters L., Budin K., Paull G.// Lancet. — 1986. — Vol. 1 (8471). — P. 42.

Поступила 30.01.97.

#### THE COMPARISON OF TWO DIAGNOSTIC METHODS FOR DETECTION OF HELICOBACTER PYLORI IN GASTRIC MUCOSA

V.V. Krasin, R.Sh. Chasanov, R.I. Garifullin, P.A. Maksimov, A.P. Kiassov

#### S u m m a r y

The two diagnostic methods for detection of *Helicobacter pylori* have been tested. The first one was de-nol test, which was based on detection of the urease activity. The second one was the immunocytochemical method using the polyclonal antibodies against *Helicobacter pylori*. During the fibrogastros-copy of patients with gastric disease (20 persons) the small pieces of gastric mucosa were taken. The latter were used for preparation of smears and then for de-nol test. 18 patients have got the positive de-nol tests, and the analyses of two patients were negative. However, the *Helicobacter pylori* were detected in all cases, using the immunocytochemical staining with polyclonal antibodies against this bacterium. On the base of these results we have suggested that immunocytochemical staining of *Helicobacter pylori* is more informative and more precise than de-nol test.