

# Клинические рекомендации по выделению, идентификации и определению чувствительности *Helicobacter pylori* к антимикробным препаратам

Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ)

Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии

ГБОУ ВПО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России

Р.С. Козлов<sup>1</sup>, Н.В. Иванчик<sup>1</sup>, Н.Н. Дехнич<sup>2</sup>

<sup>1</sup> НИИ антимикробной химиотерапии ГБОУ ВПО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России, Смоленск, Россия

<sup>2</sup> Кафедра факультетской терапии ГБОУ ВПО «Смоленский государственный медицинский университет» Минздрава России, Смоленск, Россия

## Область применения

Настоящие клинические рекомендации определяют алгоритмы микробиологической диагностики геликобактерной инфекции и определения чувствительности *Helicobacter pylori* к антимикробным препаратам.

## Термины и сокращения

АМП – антимикробные препараты

ИПП – ингибиторы протонной помпы

МПК – минимальная подавляющая концентрация

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени

ЭГДС – эзофагогастродуоденоскопия

EUCAST - European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing

IARC – International Agency for Research on Cancer (Международное агентство по изучению рака)

## Введение

Открытие в 1981 году *Helicobacter pylori* и определение роли этого микроорганизма в развитии гастрита, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки явилось отправной точкой в революции терапии гастродуоденальных заболеваний [1]. Изучение патогенных свойств *H. pylori* привело к переосмыслению взглядов на патогенез не только хронического гастрита и язвенной болезни, но и некардиального рака желудка, MALT-лимфомы [2-6]. По оценке D. Forman [7], до 75% случаев рака желудка в развитых странах, и около 90% в развивающихся странах связано с *H. pylori*-инфекцией. В 1994 г. Международное агентство по изучению рака (IARC) отнесло геликобактерную инфекцию к канцерогенам первого класса [8]. Кроме того, имеются данные о связи между *H. pylori* инфекцией и рядом негастродуоденальных заболеваний, в частности железодефицитной анемией, идиопатической тромбоцитопенической пурпурой, а также дефицитом витамина В<sub>12</sub> [9-12].

На сегодняшний день *H. pylori*-инфекция является одной из наиболее распространенных бактериальных инфекций человека. По данным ряда авторов, около 50% населения земного шара (более трех миллиардов человек) инфицировано этим микроорганизмом, причем в развивающихся странах частота инфицирования значительно выше [13-15]. Так в Российской Федерации уровень инфицирования *H. pylori* взрослого населения составляет более 80% [16]. С момента открытия *H. pylori* прошло более 30 лет. За это время разработано большое количество различных лабораторных методов, позволяющих диагностировать геликобактерную инфекцию. Однако ни один из них не является универсальным. Чувствительность каждого из методов зависит от множества факторов, особенностей течения заболевания, предшествующей терапии. Все существующие на сегодняшний день методы лабораторной диагностики *H. pylori* делятся на инвазивные и неинвазивные.

К неинвазивным методам относятся:

- изотопный дыхательный тест с мочевиной, меченой  $^{13}\text{C}$  – считается эталонным и рекомендован как для первичной диагностики, так и для контроля успешности эрадикации;
- определение антигена *H. pylori* в кале;
- определение антител *H. pylori* в сыворотке крови (серологический метод);
- выявление *H. pylori* в кале методом полимеразной цепной реакции (ПЦР).
- Инвазивные методы диагностики *H. pylori* в биоптате слизистой оболочки желудка выполняются в рамках эзофагогастродуоденоскопии. К ним относятся:
- быстрый уреазный тест с биоптатом (биоптат помещается на индикаторный диск тест-системы);
- гистологическое исследование (с окрашиванием биоптатов);
- полимеразная цепная реакция с гастробиоптатами;
- бактериологическое исследование биоптатов с определением чувствительности выделенных штаммов к антимикробным препаратам (АМП).

Бактериологический метод позволяет выделить чистую культуру *H. pylori*, провести ее идентификацию, изучить морфологические, биохимические и биологические свойства, мониторировать резистентность к АМП для подбора эффективных схем эмпирической терапии. Данный метод характеризуется 100% специфичностью в отношении *H. pylori*. Внутривидовое типирование штаммов позволяет отслеживать источники инфицирования и пути передачи инфекции, дифференцировать реинфицирование новым штаммом и рецидив инфекции. Выделенные чистые культуры *H. pylori* используются в научных целях для изучения механизмов резистентности, факторов патогенности, разработки вакцин.

В настоящее время, с появлением коммерческих питательных сред и диагностических систем, этот метод может быть внедрен в работу любой лаборатории клинической микробиологии.

### **Требования к обеспечению выполнения технологии исследования**

#### **Требования к специалистам и вспомогательному персоналу**

Компетентность персонала, участвующего в проведении исследований, должна соответствовать требованиям к образованию, знаниям и умениям специалистов согласно ГОСТ Р ИСО 15189 – 2009 [17].

#### **Требования к обеспечению безопасности труда медицинского персонала**

Требования по безопасности труда при выполнении технологии соответствуют общим правилам безопасности при работе в клиничко-диагностической лаборатории согласно ГОСТ Р 52905-2007. В лаборатории должны соблюдаться правила биологической безопасности, правила сбора и удаления отходов, правила работы с электроприборами и реактивами, пожарной безопасности [18, 19].

#### **Материально-техническое обеспечение лабораторных исследований**

Для проведения бактериологической диагностики геликобактерной инфекции помимо стандартного оснащения микробиологической лаборатории, имеющей разрешение на работу с микроорганизмами III-IV групп патогенности (приложение 1), необходимы следующие материальные ресурсы:

1. транспортные стерильные пробирки;
2. физиологический раствор или фосфатно-солевой буфер;
3. транспортные среды (см. приложение 1);
4. анаэроустат-контейнер и газогенерирующие пакеты или Anoxomat (Advanced Instruments, Великобритания) + баллоны с газовыми смесями (см. приложение 1);

5. питательные среды для культивирования *H. pylori*: кровяной агар (основа агар Мюллера-Хинтон, Brucella агар, Columbia агар с добавлением 5% бараньей или лошадиной крови), селективные среды (см. приложение 1);
6. наборы реагентов для выявления ДНК *H. pylori*;
7. инокулятор для многоточечного раскапывания;
8. химически чистые субстанции АМП или коммерческие тесты для определения чувствительности (см. приложение 1);
9. контрольные штаммы: *H. pylori* ATCC 43504 (NCTC11637), *E. coli* ATCC 25922, *P. aeruginosa* ATCC 27853.

### **Получение биопсийного материала для бактериологического исследования**

Биопсийный материал для выделения *H. pylori* необходимо получать до начала антибиотикотерапии, либо при неэффективности предшествующего лечения, до назначения нового режима антибиотикотерапии. Перед получением биопсийного материала для посева рекомендовано за 14 дней прекратить прием ИПП, препаратов висмута и антибиотиков. Взятие биопсийного материала из слизистой оболочки желудка для бактериологического исследования на *H. pylori* не исключает других методов диагностики (например, проведение быстрого уреазного теста или гистологического исследования). Отрицательный результат быстрого уреазного теста или других методов диагностики *H. pylori* не исключает возможности выделения данного возбудителя бактериологическим методом.

Поскольку бактерии *H. pylori* могут быть разбросаны по слизистой оболочке желудка в виде очагов, то с целью повышения чувствительности метода (вероятности выявления *H. pylori*) в ходе эндоскопического исследования осуществляется взятие двух биопсийных образцов из антрального отдела (на 2-3 см от привратника по передней и задней стенке) и двух из тела желудка (10 см от кардии по большой кривизне). Взятие биопсийного материала производится из мест с максимально выраженной гиперемией и отёком. Взятие материала из дна язв и эрозий, а также из их краев, является ошибкой, поскольку в них нет эпителиальных клеток, обладающих свойствами, необходимыми для адгезии и колонизации *H. pylori*. [20].

### **Хранение и транспортировка материала до первичного посева**

Четыре биоптата немедленно помещаются в транспортную пробирку. В случае, если время от взятия материала до доставки в микробиологическую лабораторию не превышает 6 ч, используется стерильная плотно закрывающаяся пробирка с 0,5-1 мл фосфатно-солевого буфера [21-24].

Если доставка будет осуществляться в течение 6-48 часов, в качестве транспортной среды используется коммерческие транспортные среды (например, Portagerm pylori, BioMerieux, Франция) (Приложение 1). Хранение и транспортировка образцов осуществляется при температуре +4<sup>0</sup>С в защищенном от света месте (контейнере).

При необходимости длительного хранения (до 6 месяцев), биоптаты могут храниться в 20-25% глицириновом бульоне при температуре -70<sup>0</sup>С, однако в этом случае жизнеспособность *H. pylori* и вероятность положительного результата бактериологического исследования снижаются [25].

### **Первичный посев**

#### **1. Гомогенизация образца.**

Для отделения бактериальных клеток от слизистой оболочки желудка, биоптат перед посевом на питательные среды гомогенизируют. Гомогенизацию можно проводить несколькими способами:

- при помощи стерильной микробиологической петли: биоптат помещается в пробирку типа эппендорф с 0,5 мл стерильного физиологического раствора и гомогенизируется петлей в течение 1 мин;
- электрическим гомогенизатором при 10 тыс. об/мин в течение 10-20 секунд. Дезинфекцию гомогенизатора проводят в 96% спирте.

## 2. Инокуляция.

По 2 капли гомогенизированного раствора помещают на поверхность чашек с неселективной (кровяной агар: основа агар Мюллера-Хинтон с добавлением 5% бараньей или лошадиной крови) и селективной (например, Pylori agar, BioMerieux, Франция) питательными средами (Приложение 1). Посев производится сплошным газоном с помощью шпателя Дригальского или бактериологической петли.

Для стабильного выделения *H. pylori* из биоптатов рекомендуется использовать готовые коммерческие стандартные селективные питательные среды. Если среды готовятся из сухих коммерческих сред, то для их розлива необходимо использовать одноразовые пластиковые чашки Петри диаметром 90 мм.

## 3. Инкубация чашек.

Чашки с посевами немедленно помещают в анаэроустат-контейнер, в котором с помощью прибора «Аноксомат» (Advanced Instruments, Великобритания) или с помощью коммерческих газогенерирующих пакетов (например, GENbox microaer, BioMerieux, Франция или Campy Pak, Becton Dickinson, США) создается микроаэрофильная атмосфера (O<sub>2</sub>-11%, CO<sub>2</sub>-9%, NO<sub>2</sub>-80%).

Посевы инкубируются в термостате при температуре +35-+37°C и влажности 95%. Учет результатов посева проводится через 4 суток. На кровяном агаре и Pylori agar на 3-5 сутки при первичном посеве, а так же на 2-3-и сутки при пересевах чистой культуры, *H. pylori* формирует мелкие, круглые, гладкие, прозрачные, похожие на «капли росы» колонии диаметром 1-3 мм. В случае отсутствия признаков роста, инкубация продляется до 10-14 суток [23, 26, 27, 28].

## Фенотипические методы идентификации *H. pylori*

### 1. Идентификация на основе морфологических и биохимических свойств

При получении роста колоний по морфологии сходных с *H. pylori*, проводится их предварительная идентификация, которая включает в себя окраску мазка по Граму и 3 биохимических теста – уреазный, каталазный и оксидазный (табл. 1).

Таблица 1. Идентификация *H. pylori*

Окраска по Граму	Характер роста на селективной среде	Уреаза	Каталаза	Оксидаза
Грамотрицательные извитые S-образные палочки	При культивировании в микроаэрофильной атмосфере, повышенной влажности при +37°C на Pylori agar через 3-7 суток образуются мелкие, круглые, гладкие, прозрачные как «капли росы» колонии диаметром 1-3 мм	+++	+	+

**Уреазный тест с чистой культурой *H. pylori*** ставят в пробирках типа Эппендорф 1,5-2 мл. Для этого в пробирку вносят 2% раствор мочевины по Кристенсену с индикатором феноловым красным, а затем добавляют исследуемую культуру. Результаты реакции наблюдают в первую секунду - раствор мочевины резко изменяет свою окраску с ярко-желтой на темно-малиновую. Негативный контроль - суточная культура *E. coli* ATCC 25922.

**Оксидазный тест**, определяющий способность *H. pylori* продуцировать цитохром-оксидазу, выполняют, нанося исследуемую культуру петлей на коммерческие диски с оксидазой. Позитивные *H. pylori* приобретают пурпурную окраску через 5-10 секунд. Негативный контроль — *E. coli* ATCC 25922, позитивный контроль — *P. aeruginosa* ATCC 27853.

**Каталазный тест**, определяющий способность *H. pylori* продуцировать каталазу, выполняют, внося агаровую культуру *H. pylori* в каплю H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на стекле. Через 3-5 секунд во взвеси каталазопозитивной культуры *H. pylori* происходит образование пузырьков газа. При постановке теста с культурой, выросшей на кровяном агаре, для предотвращения ложноположительных результатов теста, следует избегать захвата среды. Позитивным контролем служит суточная агаровая культура *E. coli* ATCC 25922, негативным — любой стрептококк.

## 2. Идентификация с применением молекулярно-генетических методов

Существуют коммерческие тест-системы на основе технологии амплификации нуклеиновых кислот, прежде всего полимеразная цепная реакция в режиме реального времени (ПЦР-РВ). Данный метод является особенно перспективным для прямого выявления ДНК *H. pylori*, а также отдельных генетических детерминант вирулентности и резистентности не только в выделенной культуре микроорганизма, но и непосредственно в клиническом материале.

## 3. Время-пролетная масс-спектрометрия (MALDI-TOF MS).

Для идентификации *H. pylori* может использоваться профилирование рибосомальных белков с использованием метода MALDI-TOF MS (при этом необходима специфическая пробоподготовка исследуемой культуры в соответствии с рекомендациями производителя).

### Хранение штаммов

Выделенные штаммы хранятся в пробирках с триптиказо-соевым бульоном с добавлением 30% стерильного глицерина при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ .

### Определение чувствительности к АМП

В соответствии с рекомендациями Европейского комитета по определению чувствительности к антимикробным препаратам (European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing – EUCAST, v.5.0) [29] и Клиническими Рекомендациями по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (версия 2015-02) [30] исследование чувствительности *H. pylori* проводится путем определения минимальных подавляющих концентраций (МПК) методами микроразведений в бульоне, либо градиентным методом.

При тестировании методами разведений используются двойные серийные разведения химически чистых субстанций антибиотиков.

Методы определения чувствительности *H. pylori* к АМП приведены в таблице 2.

**Таблица 2.** Методы определения чувствительности *H. pylori* к антимикробным препаратам

	Микроразведения в бульоне <sup>1</sup>	Градиентный метод <sup>2</sup>
<b>Среда</b>	Катион-сбалансированный бульон Мюллера-Хинтон + 5% лизированная лошадиная кровь и 20 мг/л $\beta$ -NAD	В соответствии с рекомендациями производителя
<b>Инокулюм</b>	$\geq 48$ -часовую культуру, разведенную 3-5 мл стерильного физиологического раствора до достижения плотности, эквивалентной стандарту мутности 2 по МакФарланду с непосредственной последующей инокуляцией	
<b>Инкубация</b>	Температура $+35$ - $+37^{\circ}\text{C}$ . Атмосфера микроаэрофильная <sup>3</sup> . Длительность $\geq 72$ ч (до появления хорошо видимого роста)	
<b>Учет результата</b>	За значение МПК принимается наименьшая концентрация антибиотика, при которой наблюдается значимое снижение мутности.	Колонии <i>H. pylori</i> мелкие, прозрачные и трудноразличимые. При определении значения МПК используйте увеличительное стекло или смотрите на поверхность чашки под углом. Для бактерицидных препаратов (амоксициллин, левофлоксацин, метронидазол, рифампицин) значение МПК соответствует полному отсутствию роста микроорганизма, включая микроколонии, «пылевидный» рост и отдельные колонии. Для бактериостатических препаратов (кларитромицин, тетрациклин) при «размытой» зоне подавления роста учитывайте 80% от края зоны ингибирования роста.

<sup>1</sup> European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing – EUCAST, v.5.0 и Клинические Рекомендации по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (версия 2015-02)

<sup>2</sup> Oxoid M.I.C.Evaluator™ (M.I.C.E.) Strips, Etest® (bioMerieux, Франция), MIC Test Strip (Liofilchem, Италия)

<sup>3</sup> Для метронидазола первые 24 ч инкубации в анаэробных условиях, затем  $\geq 48$  ч – в микроаэрофильных условиях.

Рекомендуется определять чувствительность *H. pylori* к амоксициллину, кларитромицину, тетрациклину, метронидазолу, левофлоксацину и рифампицину.

Критерии интерпретации результатов определения чувствительности *H. pylori* к антимикробным препаратам, а также референсные значения МПК для контрольного штамма представлены в табл. 3.

**Таблица 3.** Критерии оценки чувствительности *H. pylori* к антимикробным препаратам [27, 28]

Препарат	Референсные значения МПК (мг/л) для контрольного штамма <i>H. pylori</i> ATCC 43504 (NCTC11637)	МПК, мг/л	
		Чувствительный <sup>1</sup> , ≤	Резистентный <sup>1</sup> , >
Амоксициллин	0,015-0,125	0,125	0,125
Кларитромицин	0,015-0,125	0,25	0,5
Левофлоксацин	- <sup>2</sup>	1,0	1,0
Тетрациклин	0,125-1	1,0	1,0
Метронидазол	64-256	8,0	8,0
Рифампицин	- <sup>2</sup>	1,0	1,0

<sup>1</sup> Данные критерии не являются клиническими, а представляют собой эпидемиологические пограничные значения, разделяющие штаммы с природной чувствительностью и штаммы со сниженной чувствительностью.

<sup>2</sup> Референсные значения МПК для данного контрольного штамма отсутствуют.

### Список литературы

1. Warren, J.R., and B. Marshall. 1983. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis. *Lancet* i:1273-1275.
2. Маев И.В. Современные представления о заболеваниях желудочно-кишечного тракта, ассоциированных с *Helicobacter pylori*. *Терапевтический архив* 2006; 78(2):10-5.
3. Malfertheiner, P., Megraud, F., O'Morain, C., et al. Management of *Helicobacter pylori* infection – the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut* 2012; 61(5):646-64.
4. Uemura, N., Okamoto, S., Yamamoto, S., et al. *Helicobacter pylori* infection and the development of gastric cancer. *N Engl J Med* 2001; 345:784-9.
5. Leung W.K., Lin S.R., Ching J.Y. et al. Factors predicting progression of gastric intestinal metaplasia: results of a randomized trial on *Helicobacter pylori* eradication. *Gut* 2004; 53:1244-9.
6. Farinha P., Gascoyne R.D. *Helicobacter pylori* and MALT lymphoma. *Gastroenterology* 2005; 128:1579-605.
7. Forman D. *Helicobacter pylori*: the gastric cancer problem. *Gut* 1998; 43 (Suppl 1): S33—S34.
8. IARC. Working Group. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter Pylori*, Vol. 61. Lyon, France: IARC, 1994.
9. Muhsen K., Cohen D. *Helicobacter pylori* infection and iron stores: a systematic review and meta-analysis. *Helicobacter* 2008; 13(5):323-40.
10. Qu X.N., Huang X.L., Xiong P., et al. Does *Helicobacter pylori* infection play a role in iron deficiency anemia? A meta-analysis. *World J Gastroenterol* 2010; 16(7):886-96.
11. Arnold D.M., Bernotas A., Nazi I., et al. Platelet count response to *H. pylori* treatment in patients with immune thrombocytopenic purpura with and without *H. pylori* infection: a systematic review. *Haematologica* 2009; 94(6):850-6.
12. Vitale G., Barbaro F., Ianiro G., et al. Nutritional aspects of *Helicobacter pylori* infection. *Minerva Gastroenterol. Dietol* 2011; 57(4):369-77.
13. Leonardo H. Eusebi, Rocco M. Zagari and Franco Bazzoli. Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection. 2014 John Wiley & Sons Ltd, *Helicobacter* 19 (Suppl.1): 1-5.
14. Go M.F. Review article: natural history and epidemiology of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16(Suppl1):3-15.
15. Salih B.A. *Helicobacter pylori* infection in developing countries: The burden for how long? *Saudi J Gastroenterol* 2009; 15(3):201-7.

16. Гастроэнтерология: национальное руководство. Под ред. В.Т. Ивашкина, Т.Л. Лапиной. - М.: ГЭОТАР-Медиа, 2008. – 704 с. (серия Национальные руководства).
17. ГОСТ Р ИСО 15189 – 2009. Национальный стандарт Российской Федерации. Лаборатории медицинские. Частные требования к качеству и компетентности.
18. ГОСТ Р 52905 – 2007. Национальный стандарт Российской Федерации. Лаборатории медицинские. Требования безопасности.
19. СП 1.3.2322-08 "Безопасность работы с микроорганизмами III - IV групп патогенности (опасности) и возбудителями паразитарных болезней"
20. Ивашкин В.Т., Маев И.В., Лапина Т.Л., Шептулин А.А. и комитет экспертов. Рекомендации Российской Гастроэнтерологической Ассоциации по диагностике и лечению инфекции *Helicobacter pylori* у взрослых. Рос журн гастроэнт гепатол колопроктол 2012; 22(1):87-9.
21. Meunier, O., P. Walter, P. Chamouard, Y. Peimont and H. Monteil. 1997. Isolation of *Helicobacter pylori*: necessity of control of transport conditions. Pathol. Biol. (Paris) 45:82-85.
22. Clinical Microbiology Procedures. Handbook. Henry D. Isenberg. Second Edition. 3.8.4.1.
23. Grove, D.I., R.A.B. McLeay, K.E. Byron and G. Koutsouridis. 2001. Isolation of *Helicobacter pylori* after transport from regional laboratory of gastric biopsy specimens in saline, Portagerm *pylori* or cultured on chocolate agar. Pathology 33:362-364.
24. Heep, M., K. Scheibl, A. Degrell and N. Lehn. 1999. Transport and storage of fresh and frozen gastric biopsy specimens for optimal recovery of *Helicobacter pylori*. J. Clin. Microbiol. 37: 3764-3766.
25. Han, S.W., R. Flamm, C.Y. Hachem, H.Y. Kim, J.E. Clarridge, D.G Evans, J. Beyer, J. Drnec, and D.Y.Graham. 1995. Transport and storage of *Helicobacter pylori* from gastric mucosal biopsies and clinical isolates. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 14: 349-352.
26. Piccolomini, R., G. DeBonaventura, G. Festi, G. Gamato, F. Laterza, and M. Neri. 1997. Optimal combination of media for primary isolation of *Helicobacter pylori* from gastric biopsy specimens. J. Clin. Microbiol. 35:1541-1544.
27. Van der Hulst, R.W.M., S.B. Verheul, J.F.L.Well, Y. Gerrits, F.J.W. Tenkate, J. Dankert, and G.N.J. Tytgat. 1996. Effect of specimen collection techniques, transport media, and incubation of cultures on the detection rate of *Helicobacter pylori*. Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.15:211-215.
28. Francis Me.graud\* and Philippe Lehours *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing CLINICAL MICROBIOLOGY REVIEWS, Apr. 2007, p. 280–322 Vol. 20, No. 2
29. EUCAST v.5.0 (European Committee on Antimicrobial Susceptibility testing).
30. Клинические Рекомендациями по определению чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам (версия 2015-02).

**Материально-техническое оснащение, необходимое для выполнения исследования**

1. Ламинарный бокс 2 класса биологической безопасности, оснащенный HEPA-фильтром.
2. Микроскоп бинокулярный с осветителем с набором объективов и окуляров.
3. Термостат электрический для выращивания бактерий, поддерживающий температуру в камере в пределах  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ .
4. Дистиллятор.
5. Автоклав электрический.
6. Сухожаровой шкаф.
7. Холодильник, поддерживающий температуру  $+4-6^\circ\text{C}$  для хранения готовых питательных сред, биологических субстратов и реагентов.
8. Низкотемпературный холодильник.
9. Спиртовые или газовые горелки.
10. Стандарт мутности по МакФарланду или прибор для определения концентрации бактериальных клеток.
11. Стерильные одноразовые чашки Петри.
12. Петли бактериологические.
13. Шпатели Дригальского стерильные.
14. Стекла предметные для микропрепаратов.
15. Набор реагентов для окраски мазков по Граму.
16. Иммерсионное масло.
17. Реагенты для определения уреазной, каталазной и оксидазной активности.
18. Дозаторы переменного объема полуавтоматические.
19. Пипетки пластиковые пастеровские для переноса жидкостей.
20. Контейнеры для сброса отходов.
21. Емкости с дезинфицирующим раствором.
22. Пакеты для автоклавирования.

**Дополнительное оснащение**

1. Коммерческие транспортные среды для транспортировки биоплатов:
  - Portagerm pylori (PORT-PYL) BioMerieux, (Франция). Данная среда стабильно поддерживает жизнеспособность *H. pylori* в биопсийном материале до 2-х суток, чистая культура *H. pylori* в этой среде может сохранять свою жизнеспособность в течение 4-5 дней [18-19];
  - Среда Кэри-Блэра, HiMedia Laboratories Pvt. Limited (Индия).
2. Для создания микроаэрофильных условий могут быть использованы:
  - анаэроустат-контейнер (например, GENbox BioMerieux, Франция или Анаэроустаты GasPak, Becton Dickinson, США);
  - газогенерирующие пакеты (например, GENbox microaer, BioMerieux, Франция или Campy Pak, Becton Dickinson, США).
3. Селективные среды для культивирования *H. pylori*:
  - Pylori agar (BioMerieux, Франция);
  - BD Helicobacter Agar, Modified (Becton Dickinson, США).
4. Коммерческие градиентные тесты для определения чувствительности:
  - Etest<sup>®</sup> BioMerieux, Франция;
  - Oxoid M.I.C.Evaluator<sup>™</sup> (M.I.C.E.) Strips;
  - MIC Test Strip, Liofilchem, Италия.



<b>Схема выделения и идентификации <i>Helicobacter pylori</i> из биоптатов слизистой оболочки желудка</b>					
<p><b>Взятие биоптатов</b></p> 		<p><b>Взятие 2-х биопсийных образцов из тела и 2-х из антрального отдела желудка при эзофагогастродуоденоскопии из мест с максимально выраженной гиперемией и отёком. Нельзя брать материал из дна и краев язв и эрозий!</b></p>			
<p><b>Быстрый уреазный тест</b></p>  <p><b>Фрагмент биоптата помещается на индикаторный диск тест-системы</b></p>		<p><b>Транспортировка в среде Portagerm pylori 6-48 часов от момента взятия при температуре не ниже комнатной</b></p> 	<p><b>Транспортировка в 0,5-1 мл фосфатно-солевого буфера до 6 часов от момента взятия материала</b></p> 		
<p><b>Первичный посев</b></p>  <p><b>Помещение чашки с посевом в анаэробат</b></p>		 <p><b>Культивирование на кровяном агаре и Pylori agar 3-10 суток в микроаэрофильной атмосфере при +37°C и повышенной влажности</b></p>			
<p><b>Идентификация с помощью биохимических тестов</b></p>			<p><b>Извлечение</b></p> 	<p><b>Идентификация с применением молекулярно-генетических методов</b></p> 	<p><b>Идентификация с помощью MALDI TOF MS</b></p> 
<p><b>Уреазный тест</b></p>  <p><b>1-3 мин</b></p>	<p><b>Оксидазный тест</b></p> 	<p><b>Каталазный тест</b></p> 			
<p><b><i>Helicobacter pylori</i></b></p>					
<p><b>Грамотрицательные, S-образные палочки</b></p>	<p>На Pylori agar через 3-7 суток в микроаэрофильной атмосфере, повышенной влажности при +37°C образуются мелкие, круглые, гладкие, прозрачные как «капли росы» колонии диаметром 1-3 мм</p>		<p><b>Уреаза</b> +++</p>	<p><b>Каталаза</b> +</p>	<p><b>Оксидаза</b> +</p>