



(51) МПК
A61K 49/00 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
C12Q 1/58 (2006.01)

ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА
 ПО ИНТЕЛЛЕКТУАЛЬНОЙ СОБСТВЕННОСТИ

(12) ОПИСАНИЕ ИЗОБРЕТЕНИЯ К ПАТЕНТУ

(21)(22) Заявка: 2013125371/15, 28.05.2013

(24) Дата начала отсчета срока действия патента:
 28.05.2013

Приоритет(ы):

(22) Дата подачи заявки: 28.05.2013

(43) Дата публикации заявки: 10.12.2014 Бюл. № 34

(45) Опубликовано: 10.02.2015 Бюл. № 4

(56) Список документов, цитированных в отчете о поиске: RU 97117123/13, 10.07.1999, п.п. 1-8, реферат. US2003082661 A1, 01.05.2003, с. 1-17 . WO2008111104 A, 18.09.2008, с. 1-5.

КОЗЛОВ А.В. и др., Методы диагностики хелиобактериоза, Санкт-Петербург, "Диалект", 2008, стр. 24-40

Адрес для переписки:

194100, Санкт-Петербург, ул. Новолитовская, 5, кв. 110, Плисс Михаилу Гениевичу

(73) Патентообладатель(и):

Плисс Михаил Гениевич (RU)

(54) СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ УРЕАЗОПРОДУЦИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ "БЫСТРЫЙ УРЕАЗНЫЙ ТЕСТ ГЕЛИКОБАКТЕР ТЕСТ" И УСТРОЙСТВО ДЛЯ ЕГО ПРИМЕНЕНИЯ

(57) Реферат:

Изобретение относится к медицине и может быть использовано для выявления продуцирующих уреазу микроорганизмов, в частности *Helicobacter pylori*. Для этого проводят экспресс-анализ на диагностических дисках для определения уреазной активности образцов. Диски выполнены из фильтровальной бумаги, на

которую заранее наносят мочевины, кислотно-основной индикатор, мурамидазу и кондиционирующие вещества. При наличии уреазной активности в пробе происходит цветное окрашивание индикаторного диска. Изобретение обеспечивает повышение чувствительности способа диагностики *Helicobacter pylori*. 3 пр.

RU 2 540 473 C 2

RU 2 540 473 C 2



FEDERAL SERVICE
FOR INTELLECTUAL PROPERTY

(51) Int. Cl.
A61K 49/00 (2006.01)
C12Q 1/04 (2006.01)
C12Q 1/58 (2006.01)

(12) **ABSTRACT OF INVENTION**

(21)(22) Application: **2013125371/15, 28.05.2013**

(24) Effective date for property rights:
28.05.2013

Priority:

(22) Date of filing: **28.05.2013**

(43) Application published: **10.12.2014** Bull. № 34

(45) Date of publication: **10.02.2015** Bull. № 4

Mail address:

**194100, Sankt-Peterburg, ul. Novolitovskaja, 5, kv.
110, Pliss Mikhailu Genievichu**

(73) Proprietor(s):
Pliss Mikhail Genievich (RU)

(54) **METHOD OF DETECTING UREASE-PRODUCING MICROORGANISMS "RAPID UREASE TEST HELICOBACTER TEST" AND DEVICE FOR ITS APPLICATION**

(57) Abstract:

FIELD: medicine.

SUBSTANCE: invention relates to medicine and can be used for detection of urease-producing microorganisms, in particular *Helicobacter pylori*. For this purpose express-analysis is carried out on diagnostic discs to determine urease activity of samples. Discs are made from filter paper, on which urea, acid-base

indicator, muromidase and conditioning substances are preliminarily applied. In case if urease activity is present in sample colouration of disc takes place.

EFFECT: invention provides increased sensitivity of method of *Helicobacter pylori* diagnostics.

3 ex

C 2
3 7 4 0 4 5 2
R U

R U
2 5 4 0 4 7 3
C 2

Изобретение относится к разделу аналитической химии, используемому в медико-биологических исследованиях, а именно в идентификации микроорганизмов по определению уреазной активности, и может быть использовано как в микробиологии, так и в медицине, в частности, для диагностики *Helicobacter pylori*. Данный микроорганизм отличается чрезвычайно высокой уреазной активностью, выполняемой *in vivo*: для контроля содержания равновесного аммиака.

Уреазную активность как *in vivo*, так и *in vitro* обычно измеряют по кинетике разложения мочевины и, в частности, по количеству аммиака или углекислого газа (Дж.Б. Самнер, Г.Ф. Сомерс, "Химия ферментов и методы их исследований", под ред. В.А. Энгельгардта, Иностранная литература, Москва, 1948, 584 с., с.178), выделяющихся в результате реакции ферментативного гидролиза. Для определения уреазной активности биоптатов классически используются жидкие среды, приготовляемые *ex tempore* из растворов, содержащих мочевины в воде, 50% этаноле или фосфатном буфере с кислотно-основным индикатором, обычно феноловым красным (рН перехода 6,8-8,4). Например, используемая в микробиологии среда Христйансена: мочевины 20 г/л, феноловый красный 0,012 г/л, KH_2PO_4 2 г/л, пептон 1 г/л, NaCl 5 г/л, глюкоза 10 г/л. Именно эта среда была впервые применена для определения НР в биоптатах слизистой оболочки желудка. Или среда, содержащая 2 г мочевины, 10 мг фенолового красного и азид натрия в 100 мл 0,01 М фосфатного буфера рН 6,5 (Н.В. Сафонова, А.В. Жебрун "Гастрит, язвенная болезнь и хеликобактериоз". Рекомендации для врачей, НИИ им.Пастера, Спб, 1993, 40 с., с.32). Известны уреазные коммерческие тесты, где в качестве реакционной среды используются гели. "Pyloritek" (В.Ж. Marshall and coil. Rapid urease test in the management of *Campylobacter pyloridis*-associated gastritis. *Am. J. Gastroenterol.* 1987; v.82, p.200-210; Westblom T.U. and coll. Evaluation of a rapid urease test to detect *Campylobacter pylori* infectim. *J. Clin. Microbiol.*, 1988, v.26, p.1393-1394) и коммерческий CLOtest, выпускаемый фирмой "Delta West" (Австралия) совместно с фирмой "Tri-Med Specialites Inc." (США), тесты финской фирмы БИОХИТ.

Известно авторское свидетельство СССР 1564192, С12Q 1/04 от 18.04.88 «Способ определения *Campylobacter pyloridis* при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки», где использованы плотные гелеобразные носители среды, изготовленные в виде таблетки. В качестве плотного носителя обычно используется агар, а в качестве консерванта - азид натрия. Для одного анализа используется питательная среда в количестве 0,05-0,15 мл, содержащая мочевины 15-25 г/л, фосфатный 0,01 М буфер рН 6,5 и индикатор феноловый красный 500 мг/мл. Время проведения реакции десятки минут. Известно изобретение (патент РФ 97117123.13), избранное в качестве прототипа, предполагающего проведение реакции индикации уреазной активности пробы на основе твердого гигроскопичного пористого или зернистого носителя, при этом реакция разложения мочевины и последующее выделение аммиака, вызывающего цветовую реакцию индикатора, происходит при использовании естественного количества жидкой среды, находящейся в пробе. Время проведения реакции достаточно короткое - до 5 минут.

Использование всех вышеописанных методов, равно как и избранного в качестве прототипа, предполагает анализ уреазной активности находящихся на поверхности клеток микроорганизмов ферментов для разложения кондиционированного добавками, включающими индикатор субстрата (мочевины).

При этом чувствительность метода имеет принципиальное значение, так как при анализе биоптатов или других образцов на содержание микроорганизмов возможно попадание в пробу очень небольшого количества микробных тел, что при

недостаточной чувствительности может дать ложноотрицательный результат.

Поэтому с целью дальнейшего расширения аналитических возможностей, нами предлагается вариант быстрого уреазного теста на основе твердого гигроскопичного носителя, содержащего субстрат(мочевину)в количестве от 1.0 кг до 2.5,0 кг на 1 м²,
5 один из кислотно-основных индикаторов с интервалом перехода в области от рН 3,2-5,0 до 8,2-9;0 в количестве от 21 г до 50 г на 1 м² (например, (например, бромтимоловый синий), буфер (например, фосфатный) до рН 7.0, повышающий осмотическое давление агент (например, хлористый натрий) 1200 кг на 1 м², фермент, разрушающий клеточную мембрану микроорганизма (например, мурамидазу) - 0.001 кг на м². Изготовление
10 теста производится при последовательной кристаллизации растворов вышеперечисленных веществ на фильтровальной бумаге в вытяжном шкафу при использовании в качестве растворителя воды и изопропилового спирта.

При проведении анализа биоптат помещается на индикаторный диск и производится оценка индикаторного эффекта в течение 3-4 минут. При наличии уреазопродуцирующих
15 микроорганизмов происходит разрушение клеточной оболочки вследствие повышенного осмотического градиента и воздействия ферментов. Выделяющийся внутриклеточный пул уреазы вызывает немедленную реакцию расщепления мочевины с выделением аммиака, меняющего рН среды, что и вызывает цветное окрашивание индикаторного диска. Таким образом, происходит резкое повышение чувствительности теста,
20 позволяющего выявить подпороговые количества микроорганизмов по другим методам. Применение способа делает возможной диагностику гастродуоденальной патологии человека в условиях клиничко-бактериологической лаборатории лечебно-профилактических учреждений.

В целом способ заключается в том, что реакционная среда гипертонична и содержит
25 вещества органического и неорганического происхождения, вызывающие повреждение клеточной стенки и выход в реакционную среду эндогенной уреазы.

Пример 1.

В клинику поступил больной В. в возрасте 28 лет с жалобами на боли в эпигастрии. В процессе фиброгастроскопии в антральном отделе желудка была обнаружена полную
30 эрозии, взят биопсийный материал. После деления биоптата на 3 части одна из них была помещена на тест прототипа, вторая направлена на микроскопическое исследование, третья помещена на диск по описанному выше способу.

Через 3 минуты тест прототип - результат отрицательный, при микроскопии с окраской - единичные микробные тела Хеликобактер пилори, предлагаемый тест -
35 результат положительный через 28 с, на основании чего был сделан вывод о наличии НР в материале, а следовательно, лабораторно подтвердили диагноз - пилорический хеликобактериоз, и была начата соответствующая этиотропная терапия заболевания.

Пример 2.

В клинику на дообследование поступила больная Б. в возрасте 35 лет по поводу
40 болей в эпигастрии. При фиброгастроскопии выявлен хронический субатрофический гастрит с дуодено-гастральным рефлюксом IV ст. и взят материал для исследования.

Биоптат разделен на 3 части. В процессе тестирования биоптата по варианту прототипа микроскопического метода и предложенному выше способу не выявлено
микроорганизмов - был сделан вывод об отсутствии НР.

Пример 3.

В клинику поступил больной Ф. в возрасте 48 лет с жалобами на боли в эпигастрии. В процессе фиброгастроскопии в желудке хронический атрофический гастрит,
45 хроническая язва луковицы 1.0×0.8 см, рубцовая деформация луковицы 12 п кишки.

