

НАДЕЖНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ ХЕЛИКОБАКТЕРИОЗА ПО ФЕРМЕНТАТИВНОЙ АКТИВНОСТИ МИКРООРГАНИЗМА

В.Е. МИЛЕЙКО

ООО «Синтана СМ», sintana-sm@yandex.ru

Для лечения большой группы заболеваний верхних отделов желудочно-кишечного тракта важным моментом является диагностика хеликобактериоза. Хроническая инфекция *Helicobacter pylori*, вызывающая большую группу гастроудоденальных патологий, хорошо определяется по высокой уреазной активности [1-3] бактерии. Уникальная способность *Helicobacter pylori* синтезировать в огромных количествах высокоактивный фермент уреазу выделяет его из числа других бактерий продуцентов уреазы и даёт возможность построить на этой основе селективные и высокочувствительные методики медицинской диагностики [2-5].

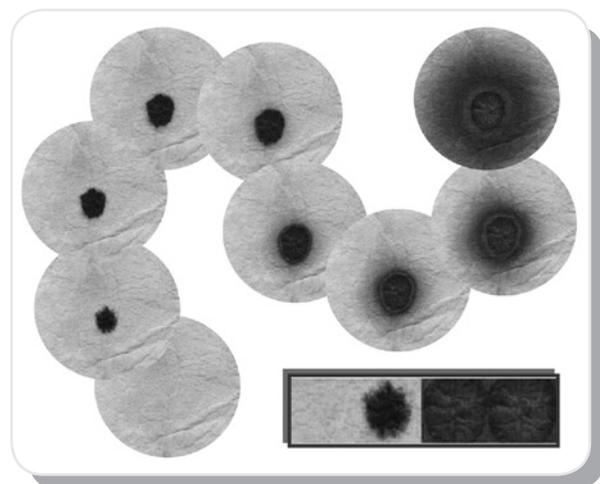
Первая из них по широте применения в медицинской среде - это методика диагностики по оценке уреазной активности биоптата. Анализ выполняется *in vitro*, после того, как биоптат получен инвазивно и травматично в ходе эндоскопического исследования. При выполнении квалифицированной прицельной биопсии этот диагностический метод достаточно достоверен и эффективен, как для первичной диагностики, так и для контроля терапии (эрадикации хеликобактера). С этой целью традиционно применяются жидкие среды, содержащие карбамид (мочевину) и кислотно-основной индикатор с рН перехода близкой к нейтральной среде. Большинство этих жидких сред содержит в своём составе фосфатный или цитратный буфер. Количество и состав буфера зачастую влияет не только на хранимость раствора, но и определяет характер перехода индикатора и скорость срабатывания

тест-системы, так как ионная сила раствора влияет на характер цветового перехода, а тип и концентрация буфера на активность микробного фермента. Активность фермента, в том числе и уреазы *Helicobacter pylori*, существенно зависит и от рН среды, что делает подбор реакционной среды весьма щепетильным делом. Тем не менее, рецептуры на основе фосфатного или сложного составного буфера с консервантами (например, азид натрия) или без таковых получили широкое распространение повсеместно. Стандартизованные тест системы выпускались и выпускаются сегодня, как в виде растворов, так и в виде гелевых таблеток. Промежуточным «двухкомпонентным вариантом» является «Де-Нол»® тест, где к лиофилизированному субстрату непосредственно перед тестированием добавляется жидкая фаза тест-системы, и уже в образовавшийся раствор помещается биоптат. Гелевые таблетки на раннем этапе существования в качестве загустителя содержали агар-агар. В настоящее время они изготавливаются главным образом на основе поливинилового спирта или других синтетических материалов, обладающих необходимыми характеристиками.

В отечественной практике достаточно широко используется, так называемый «сухой» уреазный тест [4-7]. Он разработан инициативно [7] и активно внедрен [4,6] в практику в

1997-1998 г.г. Этот уникальный тест обладает необходимой «неприхотливостью» для хранения и использования и выпускается в различных дизайнерских вариантах для продажи в России и за её пределами. Как у любого достойного изделия, активно покупаемого на рынке, у него появились конкуренты: различные варианты имитаций и подделок. Однако, оригинальный тест при правильном использовании и в самом простом «дизайнерском» варианте (рис. 1.) обладает чувствительностью и селективностью (специфичностью) близкой к 100%. При наличии реальной инвазии *Helicobacter pylori* оригинальная тест-система HelPil-test позволяет обнаружить эту инфекцию за время 15-20 секунд с момента контакта биоптата с поверхностью тест-системы. Остальное зависит от искусства эндоскописта.

Рис. 1.
Тест-система HelPil-test,
аналитическая реакция во времени.



Работа с сухим уреазным тестом при использовании тест-системы HelPil-test (производитель ООО «Синтана СМ», Санкт-Петербург, sintana.ru) выглядит следующим образом:

1. Тест-систему HelPil-test поместить на предметное стекло или чашку Петри.
2. Биоптат поместить на поверхность тест-системы HelPil-test (можно накрыть биоптат тестом, поместив его на предметное стекло).
3. Зафиксировать время различного изменения окраски тест-системы HelPil-test в зоне контакта с биоптатом с желтого цвета на синий.

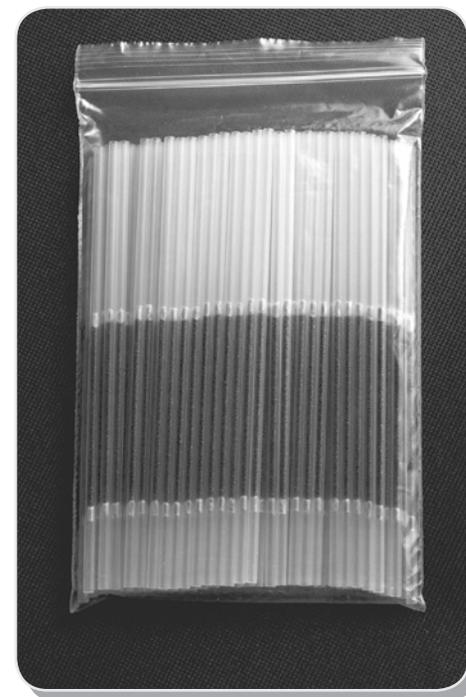
Если время изменения окраски меньше 3 минут, то тест положительный (НР+), если от 3 до 5 минут, то НР (±). Во всех других случаях тест отрицателен (НР-). Контролировать окраску более чем через 5 минут недопустимо. Чувствительность и селективность метода (патент РФ 2184781) при использовании вышеупомянутых тест-систем (рис. 2) согласно этой инструкции составляет 96-97 % [6].

Помимо анализа на уреазную активность биоптатов антрального отдела желудка или других аналогичных материалов тест-система HelPil-test может применяться и для

оценки уреазной активности любых жидкостей нейтрального характера. В качестве исследуемого материала, например, в скрининговых исследованиях в гастроэнтерологии или стоматологии можно использовать слюну. Для оценки уреазной активности слюны следует смочить тест минимальным количеством слюны и оценить окраску в том же временном интервале. Наличие синей окраски после смачивания почти всегда гарантирует наличие высокоактивной уреазы. В большинстве случаев это обусловлено присутствием инфекции *Helicobacter pylori*. В то же время следует отметить, что у курящих слюна модифицируется и имеет непредсказуемые показатели по pH, что существенно снижает селективность сухого слабо забуференного уреазного теста, каковым и является тест-система HelPil-test. Если в качестве исследуемого материала берется пот, моча или другие жидкие нейтральные биологические жидкости и тест показывает наличие в них уреазы, то следует искать других активных уреазопродукторов помимо *Helicobacter pylori*.

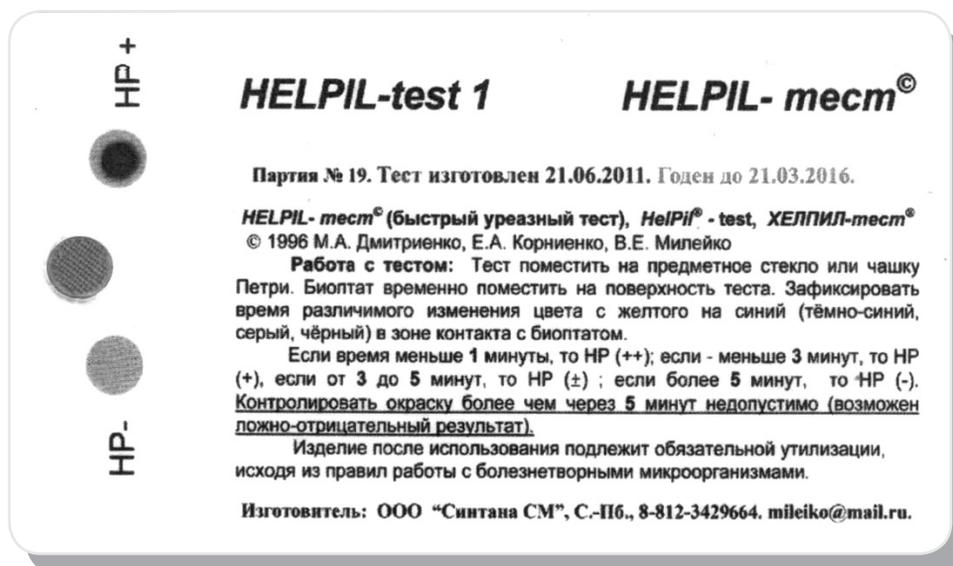
Другая методика диагностики хеликобактериоза построенная на оценке его высокой уреазной актив-

Рис. 3.
Индикаторные трубки ИТ-ННЗ
(ТУ 2291-50042073-001-2012,
производитель ООО «Синтана СМ»,
Санкт-Петербург).



ности атравматична и не связана с какими-либо медицинскими процедурами, такими как анализ крови или эзофагродуоденоскопия, используется уже 20 лет [8]. В её основе лежит анализ воздуха ротовой полости пациента на содержание аммиака. В наиболее простом и удобном случае он выполняется одноразовыми индикаторными трубками. Оценка содержания аммиака осуществляется по изменению цвета индикаторной трубки с желто-оранжевого или светло-коричневого на синие-фиолетовый или тёмно-синий, в зависимости от типа индикаторной трубки. Методика предназначена для быстрой и атравматичной диагностики инфекции *Helicobacter pylori*. Аналитическая процедура [8-11] в случае использования для диагностического исследования индикаторной трубки ИТ-ННЗ (производитель ООО «Синтана СМ», Санкт-Петербург, sintana.ru) на сегодня выполняется так [9-13]:

Рис. 2.
Тест-система HelPil-test 1
(производитель ООО «Синтана СМ», Санкт-Петербург).



Для анализа предварительно следует взять стаканчик на 20-30 мл, карбамид в количестве 0,5 грамма. Подготовить питьевую воду в количестве 40-60 мл. Растворить карбамид в 10-15 мл воды следует непосредственно перед процедурой. Анализ лучше делать утром натощак.

1. Достать из упаковки (рис. 3) индикаторную трубку ИТ-ННЗ и присоединить к прокачивающему устройству (в данном случае это стандартный медицинский шприц на 20 мл с полимерным шлангом вместо иглы) с присоединенной к нему индикаторной трубкой.
2. Приоткрыть рот и поместить свободный конец присоединенной к шприцу индикаторной трубки ИТ-ННЗ за верхние зубы, не прижимая к нёбу (рот полуоткрыт, дыхание равномерное, в трубку не дуть).
3. Через индикаторную трубку ИТ-ННЗ набрать в шприц 20 мл воздуха изо рта.
4. Затем индикаторную трубку ИТ-ННЗ вынуть изо рта и отсоединить её от шланга.
5. Если цвет индикатора изменился, измерить длину тёмно-синего участка.
6. Привести поршень шприца в исходное положение. Присоединить индикаторную трубку ИТ-ННЗ к шлангу другим концом.
7. Выпить раствор карбамида и начать отсчёт времени. Ополоснуть рот водой (15-25 мл.).
8. Ровно через 3 минуты приоткрыть рот и поместить свободный конец присоединенной к шприцу индикаторной трубки ИТ-ННЗ, за верхние зубы, не прижимая к нёбу (рот полуоткрыт, дыхание равномерное, в трубку не дуть).
9. Через индикаторную трубку ИТ-ННЗ снова набрать в шприц 20 мл воздуха изо рта.
10. Затем индикаторную трубку ИТ-ННЗ вынуть изо рта и отсоединить её от шланга.
11. Если цвет индикатора изменился, измерить длину тёмно-синего участка.

Оценка результатов анализа также достаточно проста [9,11]:

1. Изменение цвета индикаторной трубки ИТ-ННЗ при первом измерении больше чем на 3 мм говорит об инфицировании патогенными НР и наличии гастродуоденита в активной фазе эрозивного состояния.
2. Если изменение цвета индикаторной трубки ИТ-ННЗ соответствующего измерения после экспозиции в три минуты, считая с момента приема карбамида, на 2 мм и больше превышает изменение цвета при первом измерении, проведенном до приема карбамида, то это свидетельствует об инфицировании НР.
3. Если изменение цвета трубки после приема карбамида на 6 мм и больше превышает изменение цвета при первом измерении, то это говорит о совместном присутствии НР и Лямблий.
4. Для более точной оценки можно воспользоваться номограммой [9].

Методика обладает высокой чувствительностью и специфичностью (95-96 %) [11]. Она уникально проста в исполнении и надежна [12,13]. От исполнителя не требуется специальных навыков. Единственным условием для получения достоверного результата является неукоснительное следование инструкции при выполнении диагностической аналитической процедуры. Её проведение не требует более пяти минут. Она на сегодня является самым простым и эффективным тестом для диагностики инфекции *Helicobacter pylori* и может широко использоваться, как для скрининга, так и для коррекции терапии. Для контроля терапии повторное тестирование желательно провести непосредственно сразу после прохождения назначенной терапии и еще одно - через 45 дней. Методика проста в исполнении, а индикаторные трубки безопасны и просты в использовании. Надежность метода столь высока, что вышеописанная методика диагностики с индикаторными трубками индикаторной трубки ИТ-ННЗ

(производитель ООО «Синтана СМ», Санкт-Петербург, sintana.ru) может использоваться не только в широкой медицинской практике в стенах медицинских учреждений, но и использоваться для самодиагностики любым желающим. Если человек считает необходимым самостоятельно убедиться в наличии или отсутствии у него бактерии до или после лечения, ему следует ознакомиться с методикой и выполнить аналитическую процедуру строго по инструкции. При этом не следует забывать, что употребление алкоголя или медикаментов перед проведением аналитической процедуры, несомненно, исказит результат.

Для скептиков, которые любят усложнять аналитические технологии дорогой и малоэффективной приборной базой в завершение хотелось бы заметить, что кажущаяся простота устройств говорит только об их высоком технологическом уровне. Индикаторные трубки весьма неприглядные с виду, начиная с 1926 года являются, весьма эффективным и надежным средством газового экспресс анализа, особенно в тех случаях, когда дело касается здоровья и жизни человека. По селективности и чувствительности в реальной аналитической практике при анализе сложных газовых сред, содержащих аэрозоли, они не имеют равных. Эти устройства совмещают в себе «датчик», «первичный преобразователь», «вторичный преобразователь» и «дисплей» в пожаровзрывобезопасном и противоударном исполнении и позволяют получить результат «он лайн» с прекрасными временными характеристиками. Эти одноразовые приборы (линейные газоанализаторы) легко тиражируются без изменения аналитических характеристик, что делает их весьма привлекательными для использования в медицине, где одноразовость является необходимостью. Потери анализируемого вещества, связанные с отбором и хранением пробы, особенно неприятно сказываются при анализе микроконцентраций. Индикаторные трубки лишены и этого

недостатка. Они совмещают аналитическую процедуру и отбор пробы, что дает им несомненное преимущество перед теми устройствами, которые «в рот не засунешь». По химической селективности и чувствительности в рамках газового анализа физико-химические газоанализаторы на основе селективных адсорбентов - индикаторные трубки превосходят любую другую приборную базу, включая самые продвинутое варианты газоанализаторов с применением современной электроники, например один из лучших в мире ИДС-спектрометров: многоцелевой спектрометр ионного дрейфа от ООО «Лаборатория Биохимических Методов» [5]. Увы, этот ИДС-спектрометр, изготовленный, только в портативном «подарочном» варианте, не нашел широкого распространения. Поэтому рядовые пользователи не смогли убедиться в бессмысленности его тиражирования в целях тотального применения в медицине. Не лучше обстоят дела и с электрохимическими приборами на основе различных сенсоров.

Кроме того, следует отметить, что в основе принципа работы большинства индикаторных трубок лежат те же химические реакции, что и аналитические реакции, лежащие в основе методик выполнения измерений (МВИ) высшей точности (ВТ). Причем, именно МВИ ВТ используются для первичного анализа градуировочных газовых смесей, которые в дальнейшем и используются для калибровки, градуировки и поверки приборов газового анализа, которые «включаются в розетку». А то, что индикаторные трубки не «включаются в розетку», так это их свойство положительное, а не недостаток. В реальной практике это ещё одно большое преимущество. Индикаторная трубка – это и «хроматограф» с накоплением пробы на твердом адсорбенте и химический реактор, где аналитическая реакция идет почти с количественным выходом. Это устройство только с виду примитивно. А простота выполнения МВИ конечным пользователем обусловлена тем, что

всё уже сделано специалистами для удобства пользователя предварительно. При этом следует не забывать, что в условиях современной электроники получить цифровое изображение и проанализировать его цветотиметрически, в том числе и в автоматическом режиме в программах распознавания образа, даже передав на огромное расстояние, не составляет существенной инженерной проблемы, не говоря уже о документировании этой информации. Тем не менее, не нуж-

но усложнять ситуацию, когда всё и так не плохо. Усложнения отдаляют изделия от пользователя и делают их экономически не эффективными.

Именно поэтому в завершение хотелось бы напомнить, что ООО «Доктор Иванов» уже второй год предлагает к продаже наборы «Гастро-тест», предназначенные именно для индивидуального использования на основе вышеописанных тест-систем под лозунгом: «Сделай анализ себе сам!».

ЛИТЕРАТУРА

1. Marshall, B.J., Warren, J.R., Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis // Lancet 1983, June 4; p. 1273-1275.
2. Сафонова Н.В., Жебрун А.Б. Гастрит, язвенная болезнь и хеликобактериоз. Рекомендации для врачей. - СПб, 1993. 40 с.
3. Аруин Л.И., Григорьев П.Я., Исаков В.А., Яковенко Э.П. Хронический гастрит, Амстердам, 1993, 362с.
4. Корниенко Е.А. - Диагностика инфекции *Helicobacter pylori* у детей.- Методические рекомендации, СПб, НИИХ СПбГУ, 1999, 18 с.
5. Корниенко Е.А., Милейко В.Е., М.А., Самокиш В.А. - Комплекс биохимических методов диагностики *Helicobacter pylori*. - «Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии», 1998, №5(VIII), приложение №5, с.280-228.
6. Корниенко Е.А., Гольбиц С.В., Милейко В.Е. и др. О диагностике инфекции *Helicobacter pylori* у детей.//Российский вестник перинатологии и педиатрии, 1998, №5, с 34.
7. Дмитриенко М.А., Корниенко Е.А., Милейко В.Е. Патент РФ № 2184781, С 12 Q 1/04, 1/00, «Способ диагностики хеликобактериоза по оценке уреазной активности биологического материала и устройство для его осуществления», опубли. 10.07.2002 Бюл. № 19, приоритет от 30.09.1997.
8. Жебрун А.Б., Сафонова Н.В., Довгаль С.Г., Милейко В.Е., Фаловский М.В. Способ диагностики хеликобактериоза Патент РФ № 2091796, МПК 6 G01 N 33/497.- 93029859/14; Заявл. 28.05.1993; Опубли. 27.09.97, Бюл. № 27. С.396.
9. Корниенко Е.А., Милейко В.Е. Способ неинвазивной диагностики хеликобактериоза in vivo. Патент на изобретение РФ №2100010 от 27.12.97. Приоритет от 20.02.1996.
10. Ito Masaharu, Matsunobu kunitoshi, Uno Masanori, Kanemaki Susumu, Kobashi Kyoichi. US Pat. 5719052 11.01.1996// Simple examination method of infection with *Helicobacter pylori* and device therefor. 17.02.1998. - Japan Pat. 07289289 pub. 07.11.1995. Appl. 06089515, filing 27.04.1994.
11. Корниенко Е.А., Милейко В.Е. Гелик тест - неинвазивный метод диагностики хеликобактериоза // Рос. журн. гастроэнтер., гепатологии, колопрокт.-тол. -1998. - Т. 8, № 6. - С. 34 - 38.
12. Мельникова И.Ю., Милейко В.Е. Значение отечественных неинвазивных методик диагностики *Helicobacter pylori* в педиатрической практике // VII конгресс педиатров России: Детская гастроэнтерология: настоящее и будущее. М., 2002. - С. 182.
13. Мельникова И.Ю., Милейко В.Е. Десятилетняя эволюция уреазного теста в России-опыт применения метода для диагностики *Helicobacter pylori*. // Русский медицинский журнал, том 11, № 3 (175), 2003.-С.135.

ООО «Синтана СМ»

195030, г. Санкт-Петербург, пр. Наставников, д.47, к.2, подъезд 3
Тел.: (812) 663-66-81, (812) 527-37-12 Факс: (812) 342-96-64
E-mail: mileiko@mail.ru, sintana-sm@mail.ru
www.sintana.ru