

БЫСТРЫЕ УРЕАЗНЫЕ ТЕСТЫ ХЕЛПИЛ-ТЕСТ. ИСТОРИЯ СОЗДАНИЯ

Милейко В.Е., ООО «Синтана СМ» Санкт-Петербург, mileiko@mail.ru

Диагностика гастродуоденальных патологий на сегодня неразрывно связана с определением инвазии *Helicobacter pylori* (Hr) [1]. Этиопатогенная роль этой бактерии в возникновении и развитии антрального гастрита, гастродуоденита и язвенной болезни хорошо изучена [2]. Доказана и определенная роль этого микроорганизма в процессах канцерогенеза. С момента постановки проблемы идентификации этой бактерии биохимическими методами особое внимание привлекало свойство Hr выделять фермент уреазу в высокоактивной форме и в колоссальных количествах. Это свойство не только обуславливает жизнеспособность бактерии по соседству с кислой средой желудка, но и выделяет эту бактерию не только из ряда других микроорганизмов, но и из ряда бактерий продуцирующих уреазу. Такое качественное или количественное отличие уреазной активности Hr делает уреазные тесты весьма эффективным способом определения этой бактерии, как *in vitro*, так и *in vivo* [3]. Уреазные тесты, если их специально не усложнять сложным приборным оформлением или непродуманными подходами методического характера [4], весьма просты в исполнении, как в варианте, так называемой «дыхательной диагностики», так и в традиционном исполнении [5,6].

Одним из таких наиболее распространенных диагностических подходов является оценка уреазной активности биоптата полученного в ходе эндоскопического исследования. С этой целью традиционно применялись жидкие среды, содержащие карбамид (мочевину) и кислотнo-основной индикатор с pH перехода близкой к нейтральной среде. Большинство этих жидких сред содержало в своём составе фосфатный или цитратный буфер. Количество и состав буфера зачастую влияют 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 фермента. Активность фермента, в том числе и уреазы Hr, существенно зависит и от pH 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.

В начале 1992 года, когда мной и коллегами из СТ «Синтана Прозум» и НИИ ЭИМ им. Пастера был разработан и прошел апробацию первый отечественный «дыхательный» тест на основе анализа воздуха ротовой полости (выдыхаемого воздуха) на содержание аммиака индикаторными трубками ИТМ-12 [7,8], встал вопрос о параллельной высокочувствительной и эффективной методике, как методике сравнения и как методике широкого использования, с диагностическими характеристиками не хуже, чем у разрабатываемого неинвазивного теста. На тот момент в России не было промышленного варианта уреазного теста и тесты изготавливались по различным методикам непосредственно в медицинских учреждениях, а импортные образцы казались баснословно дорогими.

Поэтому предприятие СТ «Синтана Прозум» приступило к выпуску ампулированных жидкостей (рис.1).



Рис. 1. Ампулы с «жидким» уреазным тестом. Изменение цвета раствора в ходе аналитической реакции в координатах R,G.

Тест-системы представляли собой стеклянные микроампулы, заполненные титрованным до начала цветового перехода с бесцветного на красный (соломенно-желтая окраска), раствором индикатора Фенолового красного в фосфатном буфере. Ампулы заполнялись вакуумированием ёмкости с горячим раствором, а затем запаивались в стерильных условиях. При использовании ампулы носик обламывался и биоптат помещался в раствор индикатора непосредственно в ампуле. Уреазная активность оценивалась по времени появления малинового окрашивания. Такая тест-система позволяла оценить уреазную активность через 3 минуты, 15 минут и 3 часа. Она позволяла оценить наличие инвазии Hr с реальной (а не декларированной) чувствительностью и селективностью 94-95%. Следует отметить, что другие аналогичные тест-

системы, в том числе и «гелевые», например CLO-test® Бари Маршала, не превосходили микро ампулированные (и титрованные до рН точки перехода окраски индикатора) растворы по реальной чувствительности, специфичности, времени срабатывания, хранимости и другим аналитическим и диагностическим характеристикам. Аналогом жидкого уреазного теста в продвижении на российский рынок мешала не только их высокая цена, но и низкая сохраняемость (специальные условия хранения), и необходимость термостатирования при температуре выше комнатной на сутки и более в ходе проведения самой аналитической реакции.

Однако, неприязнь к отчетственным разработкам весьма популярная в начальный период перестройки не только поставила под вопрос внедрение методики «Аэротест», но и препятствовало широкому использованию жидкого уреазного теста в микроампулах.

Ради справедливости следует отметить, что методика «Аэротест» [7, 8], была ориентирована в первую очередь на выявление эрозивно-язвенных состояний в активной фазе, а уж вторично, на тотальное определение инвазии Нр (тогда ещё *Campylobacter pylori* в общепринятом понимании [9, 10]). Такая постановка вопроса на тот момент просто не могла найти сторонников ни в среде приверженцев инфекционной теории, ни в среде, тогда ещё активных, её противников. Тем не менее методика «Аэротест» к 1996 году стараниями, в первую очередь, сотрудников СТ «Синтана Прозум» и АДВ «Диреал» была внедрена более чем в 200 медицинских учреждениях. В то же время, расхождения, имеющие место при сравнении результатов методики «Аэротест» и серологических тестов, с одной стороны, и расхождения, полученные при сравнении с данными, полученными по «дыхательной» методике с радиомаркером $^{14}\text{C}^*$, с другой стороны, побудили меня, как активного приверженца развития данного направления исследований и как руководителя СТ «Синтана Прозум», начать совершенствование методики в «нагрузочном» варианте. Поэтому уже в декабре 1995 года мной и Е.А. Корниенко [11,12] была завершена разработка диагностической методики с нагрузкой карбамидом нормального изотопного состава изначально названной нами ХЕЛИК-тест. В первой статье, описывающей эту методику в варианте с использованием для анализа воздуха ротовой полости индикаторной трубки ИТМ-12, редакция журнала посчитала возможным заменить название теста на Гелик-тест [13] в соответствии с имеющими место традициями [14]. Параллельно этой стартовой разработке нами с участием высококвалифицированных сотрудников ООО «Лаборатория Биохимических Методов» был разработан приборный метод анализа с использованием спектрометра ионного дрейфа. Исследования подтвердили возможности методического подхода, но метод с ион-дрейфовым спектрометром не был внедрен из-за высокой стоимости приборной базы [15]. Отечественная оригинальная «дыхательная» диагностическая методика, которую некоторые приверженцы UBT технологии с изотопными маркерами и сегодня называют суррогатной, получила дальнейшее развитие [16-18]. За 20-ти летний период её развития (главным образом усилиями сотрудников СТ «Синтана Прозум» с 1991 по 1997 год, ООО «АМА» с 1997 года по 2002 год, ООО «Синтана СМ» с 1999 года по настоящее время и ООО «Ассоциация Медицины и Аналитики» с 2002 года по настоящее время) она получила в России и за её пределами достаточно широкое

распространение и успешно прошла различные испытания и сертификации. Эта методика достаточно широко внедрена в Российское здравоохранение в различных модификациях методического исполнения и за её будущее можно уже не волноваться [19-22].

А в 1996-1997 году дела обстояли иным образом. Методический подход и отдельные диагностические методики превосходили существующие аналоги по реальной чувствительности и селективности в сравнении с «жидким» уреазным ампулированным тестом и данными гистологических исследований, но именно поэтому они интенсивно обвинялись в «передиагностике» со стороны сторонников других разработок. И именно поэтому перед инициативной группой разработчиков (в составе Дмитриенко М.А., Корниенко В.Е. и Милейко В.Е.) встал новая задача: разработать простой в использовании высокоэффективный уреазный тест, который бы позволял не только быстро и эффективно анализировать жидкую фазу биоптата на уреазную активность, но и сохранить возможность использования того же самого биоптата для гистологических (морфологических) исследований по традиционным методикам.

В начале 1997 года эта задача была успешно решена [23,24] созданием «сухого» уреазного теста на основе впитывающего волокнистого материала, субстрата и Бромтимолового синего в качестве хромогенного вещества (рис. 2). Наилучшим материалом для теста, который с моей лёгкой руки, получил название ХЕЛПИЛ-тест, была «бумага» для биохимических тестов Малинской фабрики, которая вскоре закончилась из-за закрытия на фабрике её производства.

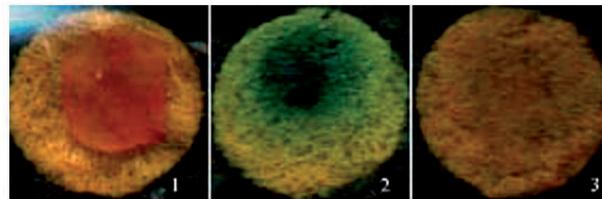


Рис. 2. Анализ биоптата авторским вариантом «сухого» уреазного теста ХЕЛПИЛ®:

1. Тест-система с помещенным на неё биоптатом.
2. Положительная реакция.
3. Отрицательная реакция.

В основе превосходства ХЕЛПИЛ-тест® над другими уреазными тестами лежат три принципиально отличающих его от других тест систем подхода. Во-первых, тест использует в качестве реакционной среды не стандартизованный раствор буфера, а как раз различную по своим свойствам межклеточную жидкость биоптата, которая отличается между собой по рН и содержанию уреазы. Бактерия сама производит удобную для анализа среду и незначит её усреднять до среды, где активность бактериальной уреазы падает или нивелируется. Во-вторых, пораженная ткань отличается морфологически. Она становится более рыхлой и содержит больше межклеточной жидкости и незначит её (отбираемую жидкую фазу) усреднять по объему. Наоборот, чем больше биоптаты отличаются по содержанию межклеточной жидкости, тем боль-

ше её впитывается в адсорбент и, следовательно, больше в количественном отношении поступает фермента для взаимодействия с субстратом. И третьим отличительным качеством теста является то, что индикатор в кислой форме является гидрофильным материалом и начинает растворяться только выше определенного pH. То есть его растворение в водной среде начинается только после стартового взаимодействия субстрата и фермента, причём хромогенное вещество в растворенной форме тут же адсорбируется силами Ван-дер-Ваальса на поверхности волокон одного из компонентов сложного адсорбента и тест-система приобретает интенсивную окраску не в объеме, а на поверхности.

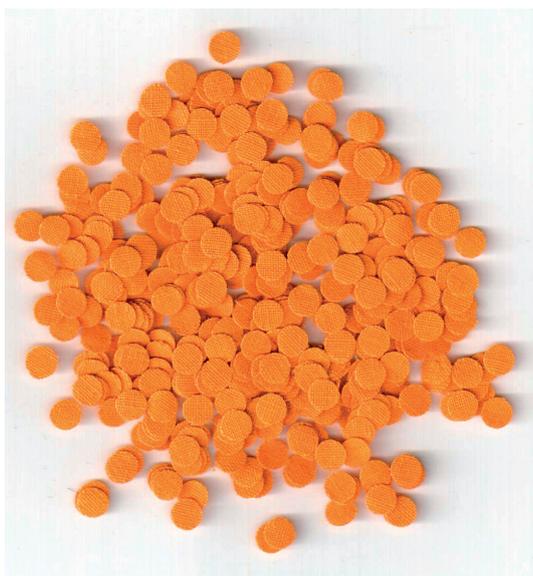


Рис. 3. Тест-системы в виде дисков не закрепленных на носитель.

Таким образом, эти различия в свойствах биоптата и тест-системы при должном подборе количеств субстрата (карбамида) и pH-индикатора и свойств самого кислотно-основного индикатора позволили удачно дифференцировать анализируемый биологический материал по присутствию Hp. «Сухой» уреазный тест ХЕЛПИЛ позволил сократить время аналитической реакции более чем в 10 раз по сравнению с самыми быстрыми вариантами «жидких» тестов. Контрольными точками стали 30 секунд, 1 минута и три минуты. Но уже через 5 минут тест становился не пригодным для оценки. Поэтому некоторые пользователи «с не привычки» умудрялись пропускать контрольное время.

Тест система ХЕЛПИЛ© выпускалась изначально в виде дисков с диаметром 4 или 5 мм и упаковывалась либо в пакеты, либо в пробирки. Анализ предполагалось проводить, либо на чашке Петри, либо контактом микросалфетки ХЕЛПИЛ-тест с биоптатом непосредственно в щипцах для биопсии до изъятия биоптата. В такой форме (рис.3) тесты под названием HelPil-test выпускаются и сегодня ООО «Синтана СМ» (sintana.ru), так как упаковки по 50, 100 и 500 аналитических единиц (штук) пользуются достаточным спросом. Одновременно с выпуском дисков ХЕЛПИЛ-тест «в россыпь» появились различные дизайн-варианты изделий. Так компания ООО «АМА» и ООО «Синтана СМ» выпускали тест-системы с закреплением диска ХЕЛПИЛ-тест на полимерную пленку на клей-

кой основе в составе держателя из картона. Аналогичную продукцию под наименованием HelPil-tests, как и «жидкий» уреазный тест, выпускает SIA «MedPro», Латвия. С 2009 года ООО «Ассоциация Медицины и Аналитики» (прошу не путать с ранее упомянутым ООО «АМА») приступила к выпуску теста под названием ХЕЛПИЛ®лента, где группа дисков закреплена на нейтральную по отношению к тесту ХЕЛПИЛ® клеевую основу. Это весьма удачное во всех отношениях технологическое решение существенно продвинуло эти тесты на рынке. Однако, тесты ХЕЛПИЛ чувствительны к газовой среде, содержащей аммиак, и анализ, проводимый одновременно на близко расположенных тест-системах может привести к ложному срабатыванию одной из них. Ранее ООО «Ассоциация Медицины и Аналитики» выпускала тест-системы только на картонном носителе под названием ХЕЛПИЛ®бланк, ХЕЛПИЛ®стандарт и ХЕЛПИЛ®планшет. Диски ХЕЛПИЛ® при этом приходится изолировать от картона «клеевой» основой, так как сам картон не является стерильным материалом и как таковой уже содержит уреазу различного происхождения. ООО «Синтана СМ» так же выпускает похожую модификацию теста, где диск ХЕЛПИЛ-тест закреплен на полимерный материал в круглом отверстии на краю носителя изготовленного из ламинированного картона под названиями HELPIL-тест 1 (рис. 4), HELPIL-тест 3, HELPIL-тест 12 (цифры по числу дисков ХЕЛПИЛ-тест на бланке) на одну, три, и двенадцать аналитических единиц (рис. 5), соответственно. В варианте, выпускающемся ООО «Синтана СМ» под названием HELPIL-test, в качестве

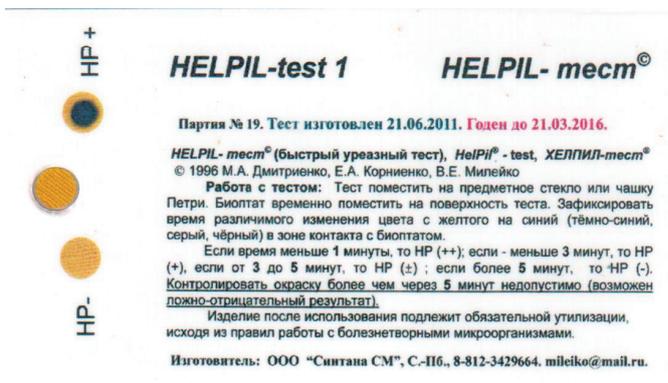


Рис. 4. HELPIL-mestm 1

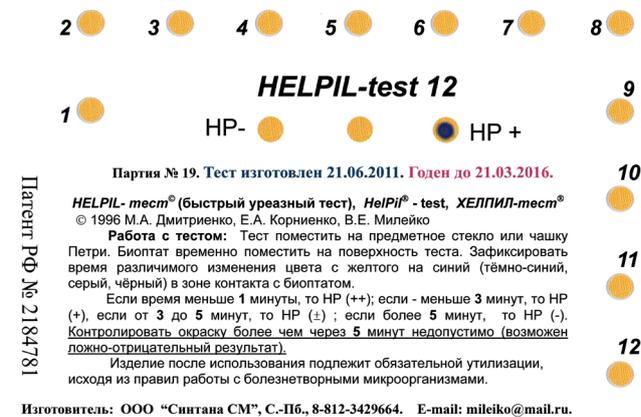


Рис. 5. HELPIL-mestm 12

Патент РФ № 2184781

носителя используются только полимерные материалы инертные по отношению к диску ХЕЛПИЛ-тест. В таком варианте оформления тест-системы прозрачное окно позволяет оценить размеры и характер пятна под исследуемым материалом, не снимая биоптата с поверхности теста. Однако, спрос на эти системы на отечественном рынке не высок из-за их стоимости. Тест системы, которые производит ООО «Синтана СМ» и ООО «Ассоциация Медицины и Аналитики», как в методике их использования, так и в конструктивном решении тест-системы, являются похожими авторскими вариантами оригинального теста ХЕЛПИЛ-тест©. В тоже время эти тест-системы, не смотря на их внешнее сходство, не являются идентичными конструктивно и технологически, так как производятся из разных впитывающих материалов и из химического сырья отличного происхождения. Каждое из них выпускается с оригинальными технологическими «НОУ ХАУ». Последнее обуславливает их различную себестоимость и разнообразие выпускных форм, а в конечном итоге и цену аналитической единицы в той или иной форме выпуска. Поэтому выбор остается за пользователем, то есть за врачом-эндоскопистом. Именно врач сам должен выбирать, что ему использовать и по какой цене покупать.

В завершение хотелось бы заметить, что видимая простота теста стимулирует наряду с описанными выше авторскими запатентованными вариантами тест-систем ХЕЛПИЛ© изготовление различного рода подделок и имитаций, что негативно влияет на ситуацию с распространением оригинальных тест-систем.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сафонова Н.В. Гастрит, язвенная болезнь и хеликобактериоз: Рекомендации для врачей /Н.В. Сафонова, А.Б. Жебрун. СПб, 1995. - 40с.
2. Кожанова М.Г. Helicobacter pylori: роль в развитии гастродуоденальных заболеваний и методы диагностики / М.Г. Кожанова // Клиническая лабораторная диагностика. 1999. -№11.- С. 52-55.
3. Милейко, В.Е. Диагностика Helicobacter pylori по его уреазной активности Текст. / В.Е. Милейко, И.Ю. Мельникова, Т.М. Григорян // Клини. эндоскопия. 2005. - №1. - С. 14-18.
4. Джагацпанян И.Э. Автоматизированный измерительный модуль для диагностики хеликобактериоза: Автореф. дис.канд. техн. наук / СПбГТИ. СПб., 1995. - 20 с.
5. Корниенко Е.А., Милейко В.Е., Дмитриенко М.А. и др. Методы оценки уреазной активности in vivo и in vitro и их место в диагностике инфекции Helicobacter pylori // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. -2000. № 2. - Прил. № 10. - С. 37-39.
6. Корниенко Е.А., Милейко В.Е., Григорян Т.М. Биохимические методы определения уреазной активности в диагностике инфекции Helicobacter pylori // Гастробюллетень: Матер. 2-й Объединен. Всерос. Всеармейск. научн. конф. СПб, 2000. -№ 1-2, прил. 1. - С. 45.
7. Жебрун А.Б., Сафонова Н.В., Довгаль С.Г., Милейко В.Е., Фаловский М.В. (Российская Федерация). Способ диагностики хеликобактериоза / Патент 2091796 RU, МПК 6 G01 N 33/497.- 93029859/14; Заявл. 28.05.1993; Оpubл. 27.09.97, Бюл. № 27. С.396.
8. Zhebrun A.B. Aerotest for Helicobacter pylori diagnosis / A.B. Zhebrun, N.V. Safonova, V.E. Mileiko et al. // Acta. Gastroenterologica, Belgica. -1993.-V.56.-p.84.
9. Щербаков П.Л. Значение пилорического кампилобактериоза в поражении верхних отделов пищеварительного тракта у детей. // Автореф. дисс. канд. мед. наук. — М.— 1991. — С.14.
10. Стародуб М.Е. Диагностика Кампилобактер пилори при хроническом гастрите, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. // Лаб. дело. — 1990. — №4. — С.4-6.
11. Корниенко Е.А., Милейко В.Е. Новый метод неинвазивной диагностики хеликобактериоза // Диагностика и лечение. — Архангельск. 1996. № 11. - С. 31-33.
12. 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).
13. Корниенко Е.А., Милейко В.Е. Гелик тест - неинвазивный метод диагностики геликобактериоза // Рос. журн. гастроэнтер., гепатологии, колопрокт.-тол. -1998. - Т. 8, № 6. - С. 34 - 38.
14. Стародуб М.Е., Гаврилюк М.Е., Чайка Н.А. Геликобактериоз и язвенная болезнь. — Л. — 1991. — 32 с.
15. Корниенко Е.А., Милейко В.Е., Самокиш В.А., Нажиганов О.Н. Неинвазивные методы диагностики инфекции, вызванной Helicobacter pylori. Педиатрия. - 1999. - № 1. - С. 37-41.
16. Мельникова И.Ю. Значение отечественных неинвазивных методик диагностики Helicobacter pylori в педиатрической практике / И.Ю. Мельникова, В.Е. Милейко // VII конгресс педиатров России: Детская гастроэнтерология: настоящее и будущее. М., 2002. - С. 182.
17. Кильдиярова, Р.Р. Неинвазивная диагностика и контроль терапии язвенной болезни и пилородуоденальных эрозий у детей Текст. /Р.Р. Кильдиярова, В.Е. Милейко // Современные тенденции развития гастроэнтерологии: Сб. трудов. Ижевск, 2004. - С. 35-36.
18. Иванов А.В., Милейко В.Е. (Российская Федерация). Способ исследования уреазной активности / Пат. 2189592 RU, МПК 7 G 01 N 33/497. 98110329/14; Заявл. 15.05.1998; Оpubл. 10.12.2001, Бюл. № 34. С.310.
19. Кильдиярова, Р.Р. Терапия инфекции Helicobacter pylori у детей по его уреазной активности: диагностика и контроль Текст. / Р.Р. Кильдиярова // Труды ИГМА. Ижевск, 2005. Т. 43. - С. 126-127.
20. Корниенко Е. А. Клиника, диагностика и лечение гастродуоденальной патологии, ассоциированных с инфекцией Helicobacter pylori у детей. Автореферат дисс. Докт. СПб 1999г. 33стр.
21. Мельникова И.Ю. Течение и исходы хронических заболеваний: гастродуоденальной зоны у детей и подростков: Автореф. дисс. док-ра. мед. наук. Санкт-Петербург. — 2005.- 306 с.
22. Дмитриенко М.А. Диагностика инфекции Helicobacter pylori по уреазной активности: Автореф. дисс. . канд. техн. наук. Санкт-Петербург. — 2003.- 180 с.
23. Корниенко Е.А., Милейко В.Е., Гольбиц С.В., Матвеев Ю.В., Антонов П.В. О диагностике инфекции Helicobacter pylori у детей // Росс. вестник перинат. педиатр. 1998. - №5. - С.34-36.
24. Дмитриенко М.А., Корниенко Е.А., Милейко В.Е. (Российская Федерация). Способ диагностики хеликобактериоза по оценке уреазной активности биологического материала и устройство для его осуществления./ Пат. 2184781 RU, МПК 7 С 12 Q1/04; Заявл. 03.09.1997; Оpubл. 10.07.2002, Бюл. № 19.