

УРЕАЗНЫЕ ТЕСТЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ХЕЛИКОБАКТЕРИОЗА

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

В 1984-86 году В.J. Marshall и J.R. Warren открыли этиопатогенную роль *Helicobacter pylori* в возникновении и развитии антрального гастрита и язвенной болезни. Впоследствии за это открытие они были удостоены звания лауреатов Нобелевской премии.

Под воздействием этого открытия само восприятие гастроэнтерологии, как науки, существенно изменились. Вследствие осознания этого открытия кардинально изменилась и терапия гастродуоденальных патологий. Гастроэнтерология стала современной динамично развивающейся частью медицинской науки. Причём, для решения вопросов эффективной диагностики и лечения хеликобактериоза были задействованы существенные интеллектуальные и финансовые средства.

Несмотря на проблемы связанные с «перестройкой» к началу 2000 года в РФ практически были созданы и внедрены в широкую практику оригинальные диагностические методики, которые позволяют быстро и точно выявить присутствие *Helicobacter pylori* в организме человека.

Эти методики весьма разнообразны. Из них самые надёжные и простые в исполнении построены на оценке уреазной активности бактерии. В основе этих инвазивных и неинвазивных методик лежит уникальная способность *Helicobacter pylori* синтезировать в огромных количествах высокоактивный фермент уреазу, что выделяет его из числа других бактерий продуцентов уреазы и даёт возможность построить на этой основе селективные и высокочувствительные методики медицинской диагностики.

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). В отечественной практике достаточно широко используется, так называемый «сухой» уреазный тест - ХЕЛПИЛ-тест (Helpil-test). Этот тест отличается от гелевого варианта - КЛО-теста (CLO-test), предложенного для этой цели Б. Маршаллом, не только названием, но аналитическим подходом.

Следует отметить, что для оценки уреазной активности биологического образца традиционно применялись жидкие среды, содержащие карбамид (мочевину) и кислотно-основной индикатор с рН перехода близкой к нейтральной среде [1]. 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 кислотно-основного перехода индикатора и скорость срабатывания тест-системы.

Причём, ионная сила раствора влияет и на характер цветового перехода, а тип и концентрация буфера в свою очередь влияет на активность фермента. Активность фермента, в том числе и уреазы *Helicobacter pylori*, существенно зависит и от рН среды. Это делает подбор реакционной среды весьма щепетильным делом. Тем не менее, рецептуры на основе фосфатного или сложного составного буфера с консервантами (например, азид натрия [2]) или без таковых получили широкое распространение повсеместно [3]. Стандартизованные тест системы выпускались и выпускаются и 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.

Наилучшими «жидкостными» тест-системами были стеклянные микро ампулы, заполненные раствором индикатора Фенолового красного в фосфатном буфере. Буфер был предварительно оттитрован до начала цветового перехода с бесцветного на красный (соломенно-желтая окраска). Ампулы заполнялись жидкостью в ёмкости с горячим раствором, а затем запаивались в стерильных условиях. В ходе применения носик ампулы обламывался и биоптат помещался в раствор индикатора непосредственно в ампуле. Уреазная активность оценивалась по времени появления малинового окрашивания. Такая тест-система с 1992 года по 1996 год выпускалась в Санкт-Петербурге компанией СТ «Синтана Прозум» под моим авторским надзором. Методика позволяла достаточно быстро оценить уреазную активность биологического образца. Время оценки результата соответствовало 3-ем минутам (+++), 15-ти минутам (++) и 3-ем часам (+). За это время удавалось весьма достоверно установить наличие инвазии *Helicobacter pylori* с чувствительностью и селективностью 94-95%. Другие аналогичные тест-системы, включая и «гелевые», не превосходили описанную выше ампулированную тест-систему по реальной чувствительности, специфичности, времени срабатывания, хранимости и другим аналитическим и диагностическим характеристикам. Но аналогам жидкого уреазного теста в микро ампулах 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.

Именно поэтому перед инициативной группой разработчиков (в составе Дмитриенко М.А., Корниенко В.Е. и Милейко В.Е.) встала новая задача: разработать простой в ис-

пользовании 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 [4] созданием «сухого» уреазного теста на основе впитывающего волокнистого материала, субстрата и Бромтимолового синего в качестве хромогенного вещества [5]. 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 её производства.

В основе превосходства методики *ХЕЛПИЛ-тест* над другими уреазными тестами лежит подход принципиально отличающий его от других тест систем. Во-первых, тест использует в качестве реакционной среды не стандартизованный раствор буфера, а как раз различную по свойствам межклеточную жидкость биоптата, которая отличается между собой по pH и содержанию уреазы. Бактерия сама производит удобную для анализа среду и незачем 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 незачем её (отбираемую жидкую фазу) усреднять по объему. Наоборот, чем больше биоптаты отличаются по содержанию межклеточной жидкости, тем больше её впитывается в адсорбент и, следовательно, больше в количественном отношении поступает фермента для взаимодействия с субстратом. 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 волокон. При этом сам «отработанный» индикатор выводится из сферы реакции.

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 *Helicobacter pylori*. «Сухой» уреазный тест *ХЕЛПИЛ* позволил сократить время аналитической реакции более чем в 10 раз по сравнению с самыми быстрыми вариантами «жидких» тестов. Контрольными точками в методике *ХЕЛПИЛ-тест* стали 30 секунд, 1 минута и три минуты. Но уже через 5 минут тест становился не пригодным для оценки. Поэтому некоторые пользователи «с непривычки» умудрялись пропускать контрольное время.

Тест-система *ХЕЛПИЛ* выпускалась изначально в виде дисков с диаметром 4 или 5 мм (рис.1) и упаковывалась либо в пакеты, либо в пробирки. Анализ предполагалось проводить, либо на чашке Петри, либо контактом микро салфетки



Рис. 1. Впитывающие диски импрегнированные индикаторной рецептурой для контроля уреазной активности биологического образца (биоптата).

год), ООО «Синтана СМ» (с 1999 года по настоящий момент) и ООО «Ассоциация Медицины и Аналитики» (с 2003 года по настоящий момент) выпускали или продолжают выпускать тест-системы с различным закреплением диска *ХЕЛПИЛ* на полимерную пленку 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» приступила к выпуску теста под названием *ХЕЛПИЛ* лент, где группа дисков закреплена на нейтральную по отношению к тест-системе *ХЕЛПИЛ* клеевую основу.

К недостаткам методики можно отнести то, что тест-системы *ХЕЛПИЛ* чувствительны к газовой среде, содержащей аммиак, и анализ, проводимый одновременно на близко расположенных тест-системах может привести к ложному срабатыванию одной из них. К «дизайнерским» недостаткам можно отнести и то, что тест в контакте с другими материалами может утратить свои диагностические свойства или изменить аналитические характеристики. Например, ООО «Ассоциация Медицины и Аналитики» выпускает тест-системы 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. В этом легко можно убедиться с помощью воды и уреазного теста. ООО «Синтана СМ» также выпускает похожую модификацию теста под названиями

ХЕЛПИЛ-тест с биоптатом непосредственно в щипцах для биопсии до изъятия биоптата. В такой форме тест-системы под названием *HelPil-test* выпускаются и сегодня компанией ООО «Синтана СМ» (sintana.ru), так как упаковки по 50 (рис. 2), 100 и 500 аналитических единиц (штук) пользуются достаточным спросом. Одновременно с выпуском дисков «в россыпь» появились различные дизайнерские варианты изделий. Так компания ООО «АМА» (с 1997 года по 2003



Рис. 2. Впитывающий диск, закрепленный на держателе из ламинированного картона.

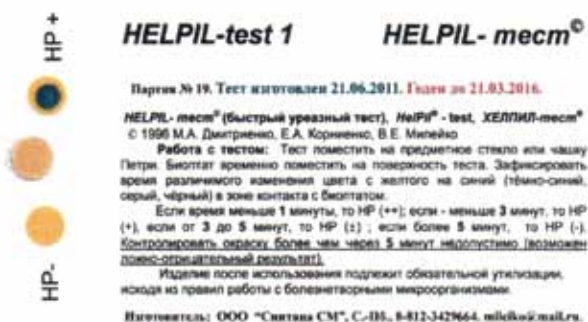


Рис. 3. Впитывающий диск, закрепленный на держателе из ламинированного картона (тест система HELPIL-test 1).

ми HELPIL-test 1 (рис. 3), HELPIL-тест 3 (рис. 4), HELPIL-test 12 (цифры по числу дисков на бланке) на одну, три, и двенадцать аналитических единиц, соответственно (рис. 5). В этих тест-системах диск ХЕЛПИЛ закреплен непосредственно на прозрачный полимерный материал в круглом отверстии на краю носителя изготовленного из ламинированного картона. 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 для выполнения методики ХЕЛПИЛ-тест. В тоже вре-



Рис. 4. Тест-система HELPIL-тест 3.

мя эти тест-системы, не смотря на их внешнее сходство, не являются идентичными конструктивно и технологически, так как производятся из разных впитывающих материалов и химического сырья иного 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.

В завершение хотелось бы заметить, что кажущаяся простота конструкции тест-системы и неприязательность аналитической методики ХЕЛПИЛ-тест стимулирует не только широкое применение метода диагностики в

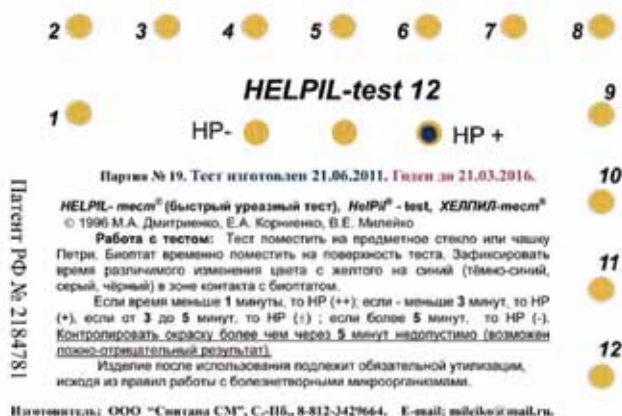


Рис. 5. Тест-система HELPIL- test 12.

реальном здравоохранении, но и провоцирует изготовление подделок и имитаций не соответствующих по потребительским свойствам вышеописанным оригинальным запатентованным авторским вариантам тест-системы, описанной выше. Это негативно влияет на ситуацию с распространением оригинальных тест-систем и вводит пользователей в заблуждение на предмет качества тестов и дееспособности оригинальной методики.

ЛИТЕРАТУРА

Григорьев П.Я., Исаков В.А., Розенталь В.М. и др., Авторское свидетельство СССР № 1564192 от 18.04.88 «Способ определения Campylobacter pyloridis при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки».

Сафонова Н.В., Жебрун А.Б. Гастрит, язвенная болезнь и хеликобактериоз. Рекомендации для врачей. - СПб, 1993. 40 с.

Аруин Л.И., Григорьев П.Я., Исаков В.А., Яковенко Э.П. Хронический гастрит, Амстердам, 1993, 362с.

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», опубл. 10.07.2002 Бюл. № 19, приоритет от 30.09.1997.

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.

ХЕЛПИЛ-тест

ООО "СИНТАНА СМ"

ОГРН 1027804896503



Что такое ХЕЛПИЛ-тест?

ХЕЛПИЛ-тест - это экспресс-тест, предназначенный для определения наличия *Helicobacter pylori* по уреазной активности биологического материала, в качестве которого может быть использован биопатат тела желудка, биопатат луковицы двенадцатиперстной кишки или биопатат антрального отдела желудка.

Как работает ХЕЛПИЛ-тест?

ХЕЛПИЛ-тест работает по принципу определения уреазной активности бактерии *Helicobacter pylori*. Из всех бактерий, вырабатывающих фермент уреазу, НР обладает такой активностью, которая способна быстро изменить окраску индикаторного диска.

Как купить ХЕЛПИЛ-тест?

Купить ХЕЛПИЛ-тест Вы можете прямо на нашем сайте, здесь и сейчас, выбрав наиболее удобный для Вас способ. Текущие цены на продукцию приведены на сайте SINTANA.RU

ХЕЛПИЛ.NET



Заказать продукцию можно:

- SINTANA-SM@MAL.RU, SINTANA-SM@YANDEX.RU
- По телефону (812) 663-66-81

ХЕЛИК.COM
интернет-магазин

Доставка по С.-Пб осуществляется курьером, доставка по России - почтой (бандероль).

Платежные реквизиты ООО "Синтана СМ" (ИНН 7810155816, КПП 781001001):

- Расчетный счет: 40702810755100141860. Северо-Западный банк ОАО "Сбербанк России", город Санкт-Петербург
- Корр.счет: 30101810500000000653
- БИК: 044030653