

# ХЕЛПИЛ-ТЕСТ. ИСТОРИЯ И СОВРЕМЕННОСТЬ ГЛАЗАМИ АВТОРА.

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


Диагностика гастродуоденальных патологий на сегодня неразрывно связана с определением инвазии *Helicobacter pylori* (Hр). Этиопатогенная роль этой бактерии в возникновении и развитии антрального гастрита, гастродуоденита и язвенной болезни хорошо изучена. Доказана и определенная роль этого микроорганизма в процессах канцерогенеза. С момента постановки проблемы идентификации этой бактерии биохимическими методами особое внимание привлекало свойство Hр 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 Hр делает уреазные тесты весьма эффективным способом определения этой бактерии, как *in vitro*, так и *in vivo*. Уреазные тесты, если их специально не усложнять сложным приборным оформлением или непродуманными подходами методического характера, весьма просты в исполнении, как в варианте, так называемой «дыхательной диагностики», так и в традиционном исполнении.

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 кислотно-основной индикатор с рН 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 Hр, 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 и сегодня, как в виде растворов, так и в виде гелевых таблеток. Промежуточным «двухкомпонентным вариантом» 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.

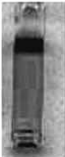


В начале 1992 года, когда мной и коллегами из СТ «Синтана Прозум» и НИИ ЭИМ им. Пастера был разработан и прошел апробацию первый отечественный «дыхательный» тест на основе анализа воздуха ротовой полости (выдыхаемого воздуха) на содержание аммиака индикаторными трубками ИТМ-12, встал вопрос о параллельной 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 разнообразным методикам непосредственно в медицинских учреждениях, а импортные образцы казались баснословно дорогими.

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

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

 Микроампульный тест с титрованным фосфатным буфером малой ёмкости (индикатор фенолового красный)

Окраска измеряется цветометрически

R		180		175		154
G		68		15		1
B		22		10		2
		HP-		HP+		HP++

Контрольное время 3, 15 и 180 минут.  
Чувствительность 98%, селективность 97%.

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

позволяла оценить наличие инвазии Нр 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. Аналогам 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 отечественным 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», была ориентирована в первую очередь на выявление эрозивно-язвенных состояний в активной фазе, а уж вторично, на тотальное определение инвазии Нр (тогда ещё *Campilobacter pylori* в общепринятом понимании). 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» 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  $^{14}C^*$ , 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 была завершена разработка диагностической методики с нагрузкой карбамидом нормального изотопного состава изначально названной нами ХЕЛИК-тест (рис. 2). 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. Параллельно этой стартовой разработке нами с участием высококвалифицированных сотрудников ООО «Лаборатория Биохимических Методов» был разработан приборный метод анализа с использованием спектрометра ионного дрейфа (рис. 3). Исследования подтвердили возможности методического подхода, но метод с ион-дрейфовым спектрометром не был внедрен из-за высокой стоимости приборной базы. Отечественная оригинальная «дыхательная» диагностическая методика, которую некоторые приверженцы UBT технологии с изотопными маркерами и сегодня называют суррогатной, получила дальнейшее развитие. За 20-ти летний период её развития (главным образом усилиями сотрудников СТ «Синтана Прозум» с 1991



Рис. 2. Выполнение методики ХЕЛИК-тест в авторском варианте на базе ФГУЗ «Детская Городская Клиническая больница № 5 им. Н.Ф.Филатова».



Рис. 3. Выполнение методики ХЕЛИК-тест с использованием экспериментального образца спектрометра ионного дрейфа в ФГУЗ «Детская Городская Клиническая больница № 5 им. Н.Ф.Филатова».

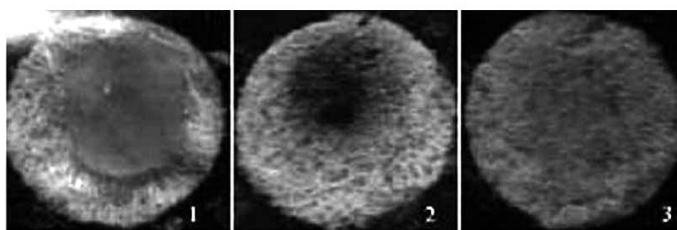


Рис. 4. Анализ биоптата авторским вариантом «сухого» уреазного теста ХЕЛПИЛ®:

Тест-система с помещенным на неё биоптатом.

Положительная реакция.

Отрицательная реакция.

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 не уже волноваться.

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.) встала 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 созданием «сухого» уреазного теста на основе впитывающего волокнистого материала, субстрата и Бромтимолового синего в качестве хромогенного вещества (рис. 4). 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.

В основе превосходства ХЕЛПИЛ-тест<sup>®</sup> 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 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. 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.

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 непривычки» умудрялись пропускать контрольное время.



Рис. 5. Тест-системы в виде дисков не закрепленных на носитель.

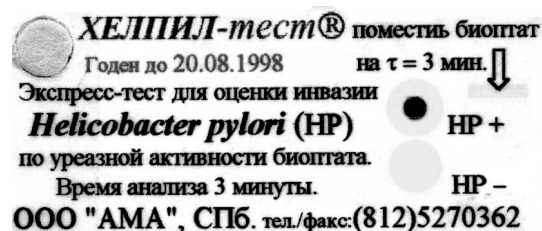


Рис. 6. Диск, закрепленный на инертную полимерную клейкую основу холодным ламинированием.



Рис. 7. ХЕЛПИЛ®лента.



Рис. 8. ХЕЛПИЛ®бланк.



Тест система ХЕЛПИЛ<sup>®</sup> 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.5) тесты под названием HelPil-test выпускаются и сегодня ООО «Синтана СМ», так как упаковки по 50, 100 и 500 аналитических единиц (штук) пользуются достаточным спросом. Одновременно с выпуском дисков ХЕЛПИЛ-тест «в россыпь» появились различные дизайнерские варианты изделий. Так компания ООО «АМА» (рис. 6) и ООО «Синтана СМ» выпускали тест-системы с закреплением диска ХЕЛПИЛ-тест на полимерную пленку на клейкой 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» приступила к выпуску теста под названием ХЕЛПИЛ<sup>®</sup>лента, где группа дисков закреплена на нейтральную по отношению к тесту ХЕЛПИЛ<sup>®</sup> клеевую основу (рис. 7). 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<sup>®</sup>бланк (рис. 8), ХЕЛПИЛ<sup>®</sup>стандарт и ХЕЛПИЛ<sup>®</sup>планшет (рис. 9). Диски ХЕЛПИЛ<sup>®</sup> 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 закреплён на полимерный материал в круглом отверстии на краю носителя изготовленного из ламинированного картона под названиями HELPIL-тест 1 (рис. 10), HELPIL-тест 3, HELPIL-тест 12 (цифры по числу дисков ХЕЛПИЛ-тест на бланке) на одну, три, и двенадцать аналитических единиц (рис. 11), соответственно. В варианте, выпускающемся ООО «Синтана СМ» под названием HELPIL-test, в качестве 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<sup>®</sup>. 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<sup>®</sup> изготовление различного рода подделок и имитаций, что негативно влияет на ситуацию с распространением оригинальных тест-систем.

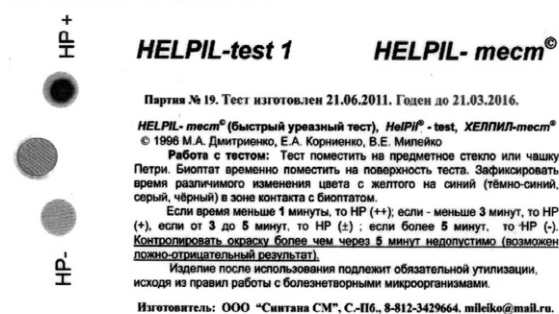
Рис. 9. ХЕЛПИЛ<sup>®</sup>планшет.

Рис. 10. HELPIL-тест 1.

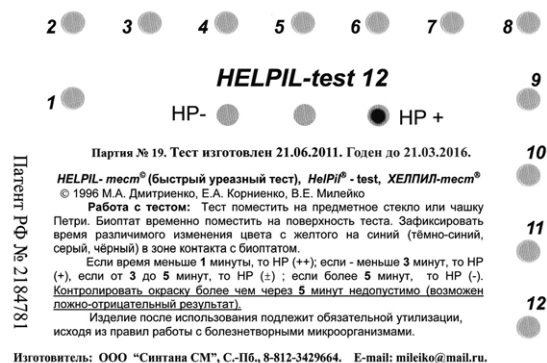


Рис. 11. HELPIL-тест 12.