ДИАГНОСТИКА HELICOBACTER PYLORI ПО ЕГО УРЕАЗНОЙ АКТИВНОСТИ

Милейко В.Е., Мельникова И.Ю., Григорян Т.М., Иванова С.Ю.

ООО «Синтана СМ», СПб Медицинская Академия Последипломного Образования, ЛОГУЗ «Детская клиническая больница», СПб Государственный Университет Технологии и Дизайна, Санкт-Петербург.

Развитие представлений о роли Helicobacterpylori(HP) тесно связано с развитием аналитических методов, пригодных для диагностических исследований, и уровнем аналитического приборостроения. Именно доступность электронной микроскопии для рутинных исследований позволила в 1983 году австралийцам J.R. Warrenи B.J. Marshallописать короткие спиралевидные бактерии длинной около 2,5 μм.. Сегодня B.J. Marshall– известный американский ученый из Хьюстона. Объект его исследований названный в последствии Helicobacterpylori(http://www.hpylori.com.au) известан каждому патоморфологу, гастроэнтерологу и эндоскописту. Этиопатогенетическое значение HP общеизвестно.

На сегодня эти представления не только закреплены в образовательных программах, но и служат развитию смежных направлений медицинской науки. Основы терапии и диагностики были заложены, а в дальнейшем и реализованы самим первооткрывателем HP. Понимая характер ферментативной активности HPи роль уреазы, B.J. Marshallпатентует группу уреазных тестов: инвазивный (на наличие высокоактивной уреазы в биопсионных образцах слизистой оболочки органов пищеварительного тракта) CLOtestв 1987 году и неинвазивный (для оценки уреазной активности желудка по изменению химических свойств выдыхаемого воздуха) «breathtest» (PYtest) в 1988 году. Эти тесты или их аналоги (HelicobacterTestINFAI) сегодня незаменимы при контроле эффективности терапии (эрадикации) инфекции HP.

Не остались в стороне и отечественные исследователи. В 1988 г Григорьев и сотр. [1] запатентовали жидкий уреазный тест на три года позже B.J. Marshall. А первый наиболее простой из всех газоаналитических уреазных тестов «Аэротест» (рис. 1) был разработан в Санкт-Петербурге неформальной научно-исследовательской группой специалистов в 1992 году и запатентован [2]. С первых дней существования неинвазивного отечественного метода он был внедрен в диагностическую практику лечебных учреждений Санкт-Петербурга, например в ЛОГУЗ «Детская клиническая больница» он используется и совершенствуется уже 12 лет. О первых результатах его использования было широко доложено. Фактически к 1996 г. для надежной диагностики HPв России уже сформировался необходимый комплекс диагностических средств, включая бактериологические и серологические методики и тест-системы отечественного производства [3-5], причем в качестве опорного метода диагностики в России всегда использовались гистолого-морфологические исследования биоптатов слизистой оболочки антрального отдела желудка и двенадцатиперстной кишки [4,5].

Признание в 1994 году Международным агенством по изучению рака (IARK) инфекции HPв качестве канцерогена и принятие Маастрихтских рекомендаций по ее диагностике и лечению явилось новым толчком к развитию диагностических методов, разделив их на методики первичной диагностики и методики контроля эрадикации: бактериологические; морфологические (окраска по Гимзе или Вартину-Старри, Генте), биохимические.

Особое место в ряду диагностических методических подходов занимает уреазный «дыхательный тест» с нерадиоактивным изотопным углеродным маркером **Meretek**UBT , который благодаря развитию приборостроения успешно прогрессирует [5]. К настоящему моменту широко используется большая группа надежных неинвазивных высокочувствительных методик конкурирующих между собой на альтернативной основе [перечислить 13-15,18,19,26,28, 29, 48,67-69]. Они не только неинвазивны, но и атравматичны.

Предлагаемые диагностические методики, опустив физико-химические аспекты и характер отбора пробы

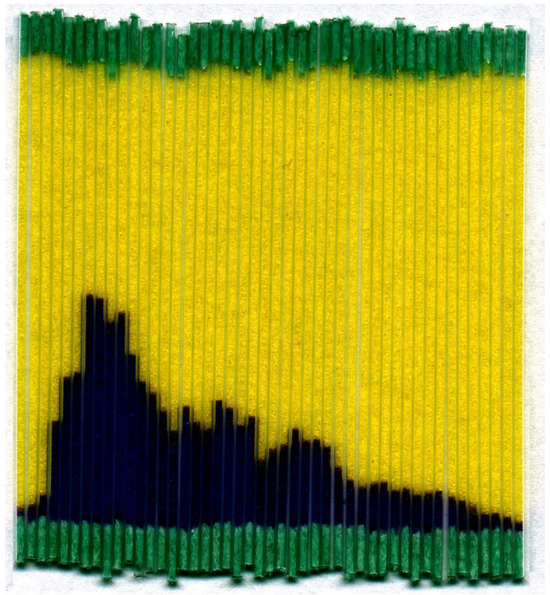

Рис. 1. Характер изменения содержания аммиака в воздухе ротовой полости. Измерения выполнены капиллярными индикаторными трубками последовательно во времени. Время отбора пробы одной трубкой – 30 секунд.

анализируемого биологического материала, можно действительно разделить на две большие группы. Методики, изучающие непосредственно микроорганизм, его внешний вид, адсорбционные, биохимические свойства, жизнеспособность и ответные реакции [3] (первая группа) и методики, изучающие ответные реакции макро организма (пациента), клиническую картину течения болезни, изменения в организме или иммунный ответ [5] (вторая группа).

Наиболее надежные методы относятся сразу к двум группам. Например, гистологический метод выявляет, как наличие бактерий, так и их дистрофическое воздействие на клетки слизистой желудка. Антропометрические характеристики, равно как и накопление никеля в волосах [6], хотя явно и не используется в качестве метода диагностики, но может быть отнесено ко второй группе. Варианты «дыхательной» (UBT) диагностики также включают элементы первой и второй группы, так как эвакуация продуктов гидролиза осуществляется макро организмом [7]. А вот вариант истинной дыхательной диагностики (изменение частоты дыхания и объема выдыхаемого воздуха в результате нагрузки, временно создаваемой у обследуемого в результате приема внутрь порции карбамида) [8] скорее относится ко второй. Повышение содержания углекислого газа, который и регулирует (изменяет) характеристики дыхания, в выдыхаемом (альвеолярном) воздухе относится только к первой группе. Серологические тесты явно относятся ко второй группе, как и эндоскопическое обследование, которое даже при визуальном осмотре позволяет судить по изменениям слизистой о ее состоянии и, следовательно, характеризовать развитие болезни. Изучение кислотопродуцирующей функции желудка в большинстве случаев, так же является косвенным методом диагностики инвазии HP, так как очевидно, что гиперацидное состояние не связанное с синдромом Золлингера-Эллисона можно расценивать как ответ организма человека на инвазию HP.

Несмотря на наличие неинвазивных методов диагностики, для контроля эрадикации обычно проводят эндоскопическое обследование с биопсией последующее гистологоморфологическое исследование биоптата [9] и уреазный тест с биоптатом.

Иммуноферментный анализ может быть широко использован для первичной или скрининговой диагностики [3-5,10], но при этом не следует забывать, что коммерческие иммуноферментные тесты на основе иммунопреципитации в принципе не пригодны для контроля эрадикации [5].

Для разработки высокоэффективных и надежных тестов в своей работе мы опирались на одно из основных свойств HP, которое выделяет его из других микроаэрофилов по ферментативной активности: синтез высокоактивной уреазы и соответствующего ей промотора. Этот фермент является жизненно важным для HP. Его он обычно продуцирует в огромных количествах для того, что бы гидролизовать карбамид, присутствующий в биологических жидкостях человека, в противоположность макро организму человека, который этот карбамид синтезирует. При этом следует отметить, что макро организм не синтезирует ферментов подобных уреазе, более того, эти ферменты и в особенности микробные весьма токсичны для млекопитающих и в частности для человека. Для HP, как для «бактерии аммиачной жизни», совершенно необходимо наличие процесса гидролиза карбамида, благодаря которому колония микроорганизмов строит свою среду обитания (pH 7,4 - 8,4) в прямом контакте с кислой средой желудочного содержимого. Кроме того, следует отметить, что уреазой называется любая группа ферментов селективно гидролизующих мочевину (карбамид) и только мочевину. Эта ферментативная реакция является классической. Ее кинетика детально изучена еще в начале прошлого века Сямнером для уреазы различного происхождения. Хорошо изучено влияние pH среды и различных ингибиторов уреазы (солей металлов, таких как висмут, серебро, золото; соединения мышьяка; органических ингибиторов), как in vitro, так и in vivo. Фермент растительного происхождения выпускается товарном виде, а способы оценки уреазной активности стандартизованы.

Надежность подхода по оценке уреазной активности не могло не привлечь внимания исследователей. Поэтому для диагностических исследований по оценке уреазной активности биоптатов были созданы тест-системы хемосорбционного типа, которые являются довольно сложными топохимическими реагентами [11] на основе волокнистых и кристаллических материалов. При этом следует отметить, что промежуточным вариантом были

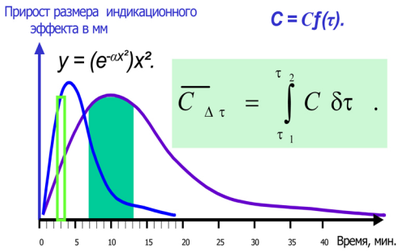

Рис. 2. Теоретическая модель изменения содержания аммиака (кривая слева) и основных газовых выделений (кривая справа) в воздухе ротовой полости после приема карбамида и измерения «средневзвешенной» концентрации аммиака индикаторными трубками различных типов.

жидкие высокоточные растворы карбамида в фосфатном буфере малой емкости и большой ионной силы (за счет солевых добавок) с Феноловым красным в качестве индикатора кислотно-основного перехода и Углоном в качестве консерванта, расфасованные в микро ампулы [12]. Применение таких растворов в микро ампулах было весьма эффективно в диагностических исследованиях, так как не только позволило стандартизировать методику, но сократило время анализа до трех минут, приблизив чувствительность и селективность метода к 100 %. Однако, фасовка растворов в микро ампулы является весьма дорогостоящей технологической процедурой и существенно влияет на стоимость анализа. Из разработанных наиболее простым в эксплуатации, эффективным, не дорогим и, соответственно, наиболее популярным можно считать «сухой» тест, называемый ХЕЛПИЛ(Htlpil)-тест. Этот тест, несмотря на кажущуюся конструктивную простоту, одновременно является гелевым тестом и газоаналитической тест-системой, что в совокупности и обуслав-

ливает его высокие рабочие характеристики: быстроту выполнения аналитической процедуры, её чувствительность и селективность.

При работе над UBTдиагностикой, начатой нами инициативно в 1992 году, мы естественно располагали результатами предшественников [13]. Нам было известно, что аммиак присутствует в выдыхаемом через нос и рот воздухе, а его содержание существенно различаются у людей в соответствии с их возрастом и состоянием здоровья. В дальнейшем нам удалось найти связь между заражением HPи содержанием аммиака в воздухе ротовой полости пациента. В выдыхаемом через нос воздухе аммиак в существенных количествах определяется только у пациентов с язвой желудка в стадии обострения. Результаты исследования были доложены в Праге [14]. Тест под названием «Аэротест» получил ограниченное распространение в качестве метода диагностики. Авторы теста вопреки распространившемуся мнению, не предполагали его широкого использования в педиатрической практике, так как тест основан на гидролизе транссудируемой из биологических жидкостей эндогенной мочевины, а ее содержание у детей раннего и младшего школьного возраста существенно ниже, чем у взрослых. Попытки внедрить его в педиатрическую практику были неоднозначны. Тем не мене тест достаточно достоверно позволял констатировать эрозивно-язвенные состояния в активной фазе (как связанные, так и не связанные с присутствием HP) у подростков и взрослых.

Необходимость диагностики и контроля инфекции HPкак таковой, в том числе и бессимптомной патологии, а не только связанной с наличием эрозивно-язвенных состояний в активной фазе, заставило нас разработать «нагрузочный дыхательный» Гелик-тест, предполагающий прием пациентом раствора карбамида нормального изотопного состава [15]. Контроль за изменением содержания аммиака в воздухе ротовой полости после нагрузки карбамидом нормального изотопного состава (рис. 1) и оценка характера этого изменения с учетом базальной концентрации (рис 2), является вполне надежной высокочувствительной и селективной методикой. Широко применяются упрощенные методики, построенные на измерении прироста содержания аммиака в ротовой полости в начальный момент его выделения. В этом случае аналитическая процедура обычно выполняется в два измерения, но одной индикаторной трубкой. Первоначально ей измеряется базальное содержание аммиака в воздухе ротовой полости. Затем трубка переворачивается другой стороной и ей повторно измеряется концентрация аммиака через 2-3 минуты после приема раствора карбамида. В зависимости от типа трубки время измерения составляет от 0,5 до 15 минут. Группа методик, проводимая несколькими типами индикаторных трубок одновременно позволяет не только установить факт инфицирования HP [15], но и оценить активность воспалительного процесса, а также вероятность сопутствующей инвазии Лямблиями. Методика может быть выполнена не только различными индикаторными трубками, но и на любой другой приборной базе, позволяющей измерять содержание аммиака и сопутствующих веществ при температуре 25-37 °С в присутствии водного аэрозоля на уровне от 0,3 мг/м3. Для этой цели весьма пригоден, например ион-дрейфовый спектрометр высокого разрешения [16-17]. Однако, следует напомнить, что применение одноразовых тест-систем в медицине не только снимает ряд вопросов связанных с санацией и дезинфекцией оборудования, до и повышает надежность и достоверность полученных данных зачастую упрощая аналитическую процедуру до требований приемлемых пользователем. Именно поэтому в медицинской практике применение одноразовых приборов, каковыми являются линейные газоанализаторы – индикаторные трубки, и других одноразовых химических и физико-химических сенсоров достаточно актуально.

Уреазный тест с биоптатом всегда был построен на реакции гидролиза карбамида и на фиксации аммиака в растворе.

С развитием CCD датчиков, цифровой фотографии, доступностью сканеров и персональных компьютеров, позволяющих свободно работать с цифровым изображением, появилась возможность автоматизировать и сделать количественной и объективной оценку результатов измерений индикаторными трубками и другими химическими сенсорами [18].

Эндоскопическое обследование, дополненное хромоскопией с Конго красным [19], позволяет не только оценить кислотопродуцирующую функцию желудка и откорректировать степень применения антацидных препаратов в терапии, но и провести предварительную диагностику инфекции HP:

Как и в неинвазивных методиках цветовые переходы индикатора (красителя) Конго красного происходят в сильно кислой среде. При оценке уреазной активности по содержанию аммиака воздухе используются существенные количества карбамида, который гидролизуется уреазой HP в желудке. В ходе этого процесса в желудке создается газовоздушная среда, обогащенная существенным количеством аммиака. Он реагирует с солянной кислотой непосредственно на слизистой желудка и часть непрерывно продуцируемой кислоты в зоне реакции нейтрализуется. Причем этот процесс протекает во времени.

Если слизистая покрыта Конго красным и в ней превалирует кислотопродуцирование, то она остается окрашенной в синий цвет. Те зоны слизистой, где гидролиз аммиака идет особенно интенсивно, обесцвечиваются в первую очередь, тем более, что места инвазии HP имеют нейтральную среду и до воздействия порции карбамида.

Если для хромогастроскопии использовали 0,2% раствор Конго красного, содержащий дополнительно и карбамид в концентрации 5%, то характер и скорость изменения цвета (из сине-черного в красный) Конго красного на слизистой желудка у инфицированных и неинфицированных HP пациентов будет отличаться существенно. Изменения цвета индикаторного раствора, нанесенного на слизистую, у пациентов, не инфицированных HP почти не наблюдаются за первые 5 минут. У пациентов с незначительной инвазией HP изменение цвета происходило медленно (2-3 минуты). У пациентов с существенной инвазией HP быстро (меньше одной минуты) происходило зональное изменение цвета индикатора на слизистой желудка, которое затем быстро распространялось на весь антральный отдел желудка.

Таким образом, методика оценки обсемененности HP по скорости изменения окраски солянокислого комплекса Конго красного (pH перехода от 3,0 до 5,2) in vivo интегрально и зонально позволяет оценить инвазию HP. Причем, наличие следов Конго красного в биоптате, как и в случае использования двух индикаторов совместно [5], не мешает использованию в уреазном тесте (ХЕЛПИЛтест) в качестве индикатора Бромтимолового синего.

Поскольку ложноположительные результаты выявления HPвлекут за собой неоправданное назначение дорогостоящего лечения, оказывающего и сопутствующее неблагоприятное влияние на различные функции организма, актуальность повышения надежности диагностических результатов несомненна. Кроме того, значительную проблему составляет и резистентность отдельных штаммов HPк составным элементам комплексной антихеликобактерной терапии. Именно с этой проблемой связывают низкую эффективность медикаментозного воздействия некоторых схем эрадикации HPна эти бактерии у части пациентов [5]. Определение чувствительности HPк различным медикаментам, в соответствии с имеющимися на настоящий момент методиками, сопряжено с взятием образцов биологического материала, например, слизистой оболочки желудка, то есть с инвазивной процедурой. При этом само изучение устойчивости HPк медикаментам выполняется в культуре in vitro, что дает весьма отдаленные представления о эфективности терапии этими медикаментами in vivo.

Дальнейшее совершенствование методики было направлено на снижение уровня гипераммониемии, связанное с приемом карбамида пациентами с высоким уровнем инвазии HP, усложнением контрольной, и нагрузочной схемы, с целью еще большего повышения селективности и чувствительности методик [20]. В рамках этих подходов предполагаются и различные формы для принимаемого карбамида (жевательная резинка [8,12], раствор или быстро растворимые гранулы и т.п.). Прогнозирование терапии и контроль её эффективности в ходе проведения лечения с целью адекватной корректировки логически вытекает из неинвазивности, атравматичности и проведения диагностики in vivo, так как диагностическая процедура может быть без ущерба для пациента проведена многократно в период предшествующий лечению, в ходе самой терапии и по её завершению. Это направление, примыкающей к традиционной диагностике, является весьма перспективным направлением продолжения наших исследований.

ЛИТЕРАТУРА

1. 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».
2. Жебрун А.Б., Сафонова Н.В., Довгаль С.Г., Милейко В.Е., Фаловский М.В. РФ Пат.№ 2091796 от 27.05.1993 «Способ диагностики хеликобактериоза».
3. Сафонова Н.В., Жебрун А.Б. Гастрит, язвенная болезнь и хеликобактериоз.Рекомендации для врачей .- СПб, 1993. 40 с.
4. Аруин Л.И., Григорьев П.Я., Исаков В.А., Яковенко Э.П. Хронический гастрит, Амстердам, 1993, 362с.
5. Helicobacter pylori: революция в гастроэнтерологии. Под редакцией акад. РАМН В.Т. Ивашкина, проф. Ф. Мегро, Т.Л. Лапиной.- М., «Триада-Х», 1999, 255 с.
6. А.В. Иванов, В.А. Шилов. Концентрация микроэлементов волос у детей с хронисеским гастродуоденитом.// Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колонопрактологии.-1998.- т. 8.№ 5 (Приложение).- с.69-70.
7. Корниенко Е.А., Милейко В.Е. Гелик-тест – неинвазивный метод диагностики геликобактериоза. – «Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии», 1998, №6, с.34-38.
8. Иванов А.В., Милейко В.Е. РФ Пат. № 2176792 от 15.05.1998 «Способ исследования уреазной активности».
9. Стандарты диагностики и лечения болезней органов пищеварения, МЗ РФ, 1998.
10. Dent J.C., Mc Nulty C.F.M., Uff J.S. et. al. Campylobacter pylori urease: a new serological test.// Lancet- 1988, p.1002.
11. Корниенко Е.А., Гольбиц С.В., Милейко В.Е. и др. О диагностике инфекции Helicobacterpyloriy детей.//Российский вестник перинатологии и педиатрии, 1998, №5, с 34.
12. Корниенко Е.А., Милейко В.Е., Григорян Т.М. Комплекс методик для диагностики инвазии Helicobacterpylori. // Сборник докладов и тезисов докладов Всероссийской конференции с международным участием «Новое в экологии и безопасности жизнедеятельности» под ред. проф. Н.И.Иванова, СПб,1997, т. 3 ,с.432-438.
13. Lyle H. Hamilton; August 14, 1990 US Pat. 4947861: Noninvasive diagnosis of gastritis and duodenitis. May 1, 1989.
14. Safonova N.V., Meelaiko V.E., Zhebrun A.B. et al. "The respiratory test for detection Helicobacteriosis." in Helicobacter pylori and the new concepts in gastroduodenal diseases.- Abstract. book, Carles University, Prague, Chechoslovakia, 1992.- P-3.
15. Корниенко Е.А., Милейко В.Е., RU2100010 C01. 27.12.1997. Способ неинвазивной диагностики хеликобактериоза ин виво. 20.02.1996.
16. E.Kornienko, O.Vashkevich, V.Mileiko, V.Samokish, «Simple Express Urea Breath Test Offers Diagnosis of Helicobacter pylori Infection» in Abstracts of Internnational Congress on Analytical Chemistry, Moscow, Russia, June 15-21, 1997, v.2, P-37.
17. Корниенко Е.А., Милейко В.Е., Самокиш В.А. и др. Неинвазивные методы диагностики инфекции, вызванной Helicobacterpylori. // Педиатрия, 1999, №1, с.37-41.
18. Денисова Е.В., Курбатова Э.А., Милейко В.Е. оценка диагностических результатов методами визуализации с последующей автоматизированной компьютерной верификацией.- с 95-97. // в сб. Школа-семинар «Актуальные проблемы современной хирургии» СПб, НИИХимии СПбГУ, 2000.- 152 с.
19. Григорян Т.М., Милейко В.Е.Оценка возможности использования хромоскопии с Конго красным для диагностики инвазии Helicobacterpylori(HP). – с50-53. // в сб. Школа-семинар «Актуальные проблемы современной хирургии» СПб, НИИХимии СПбГУ, 2000.- 152 с.
20. Mileiko V, Melnikova I, Ivanova S et al. Gas Analysis in Medical Diagnostics. P109.//Book of Abstracts – Seventh International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatographu and Hyphehated Chromatographic Analyzers (HTC-7), Brugge, February 6-8, 2002- Royal Flemish Chemical Society (KVCV), 2002, 410 p.- ISBN 90-74870-05-8