

# НЕКОТОРЫЕ АСПЕКТЫ ПРИМЕНЕНИЯ НЕИНВАЗИВНОГО АТРАВМАТИЧНОГО МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ ХЕЛИКОБАКТЕРИОЗА ПО АММИАКУ ( $\text{UVT-NH}_3$ )

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

За 29 лет, прошедших с момента открытия роли *Helicobacter pylori* (хеликобактера) в возникновении и развитии гастродуоденальных патологий, создано большое количество разнообразных методов диагностики этих заболеваний и в том числе методик обнаружения этого патогенного микроорганизма в организме человека. Многие из них сегодня внедрены в медицинскую практику и широко используются.

В этой публикации мне хотелось бы рассказать о некоторых аспектах применения оригинальной отечественной атравматичной методики диагностики. Этот методический подход используется в отечественной практике для неинвазивной диагностики хеликобактериоза, начиная с 1992 года. Метод построен на оценке уреазной активности микроба в месте его проживания. Формально он очень похож по своей сути на метод диагностики хеликобактериоза по уреазной активности биоптата, изъятых из антрального отдела желудка или луковицы двенадцатиперстной кишки в ходе эндоскопического исследования. В этом случае биоптат помещают в раствор, содержащий карбамид и кислотно-основной индикатор, и следят за изменением цвета раствора. Уреазная активность биоптата приводит к изменению pH среды за какой-то период времени. По скорости изменения pH (времени изменения цвета индикатора) и судят о наличии хеликобактера в биоптате. В отличие от этого атравматичного и инвазивного метода неинвазивный метод предполагает не доставку биоптата к карбамиду, а доставку карбамида к зонам проживания микроорганизма, где и происходит химическая реакция. В ходе процесса гидролиза карбамида, происходит массоперенос продуктов реакции за пределы зоны реакции. Часть из продуктов различными путями поступает в ротовую полость, где так же меняется pH и присутствует связанный с этим процессом аммиак и углекислый газ. Аммиак достаточно достоверно может контролироваться соответствующими методами анализа. Наиболее приемлемым из них является методический подход с использованием одноразовых линейных газоанализаторов — индикаторных трубок (ИТ).

При наличии инвазии хеликобактера этот процесс постоянно протекает в организме человека, так как в зоне проживания хеликобактера всегда присутствует эндогенная мочевины (карбамид). Увеличение содержания мочевины в зоне реакции временно усиливает выделение продуктов ферментативного гидролиза, изменяет характер массопереноса и приводит к временному значимому повышению содержания аммиака в ротовой полости. В рамках данного метода диагностики создана большая группа методик определяющих инвазию хеликобактера по содержанию аммиака в воздухе ротовой полости (в отдельных случаях это делается в выдыхаемом воздухе).

Первый вариант методики не предполагал «нагрузку» мочевиной, а оценивал только содержание аммиака в ротовой полости обусловленное ферментативным гидролизом эндогенной мочевины. В силу уникальной уреазной активности хеликобактера повышенное содержание аммиака в воздухе ротовой полости достоверно указывает на присутствие инвазии хеликобактера и течения заболевания в активной фазе. Этот тест изначально был направлен скорее не на диагностику хеликобактериоза, а на выявление язвенной болезни в активной фазе. Последнее достоверно подтверждается всеми последующими исследованиями, в том числе и теми, которые были направлены на дальнейшее совершенствование методического подхода. Исследования выявили, что это равновесное содержание аммиака, которое в дальнейшем стали называть «базальным», зависит не только от состояния здоровья пациента, но и от его возраста. Поэтому дальнейшее совершенствование методик пошло по пути создания «нагрузочной» схемы анализа. В качестве «нагрузки» использовалась мочевины. Была исследована кинетика превращения единичных порций карбамида *in vitro* и *in vivo* в достаточно широком, но безопасном для человека интервале концентраций. При этом следует отметить, что карбамид не только безвреден в небольших количествах при пероральном приеме, но и синтезируется печенью человека. Он входит в качестве необходимого компонента в состав его биологических жидкостей. А вот фермент — уреазы, и в особенности микробная уреазы, весьма токсичны для теплокровных, в том числе и для человека. Для методики, исходя из её селективности и чувствительности, оптимальной оказалась единичная порция массой 0,5 грамм. Именно это количество и рекомендовано в качестве нагрузки в методиках определяющих инфекцию хеликобактер по содержанию аммиака в воздухе ротовой полости (выдыхаемом воздухе) вне зависимости от приборной базы в которой реализуется этот способ диагностики.

Однако в методике «Аэротест», построенной на определении равновесной (базальной) концентрации аммиака в выдыхаемом воздухе ( $\text{C}_1$ ) «нагрузка» карбамидом не использовалась. Определение концентрации аммиака ( $0,01-3,0 \text{ мг/м}^3$ ) осуществлялось с помощью линейных газоанализаторов индикаторных трубок, как в традиционном, так и в капиллярном варианте, а также с использованием пассивных фронтальных колориметрических дозиметров. Временная продолжительность аналитической процедуры занимала от 30 секунд до 5 минут в зависимости от применяемого теста. Обычно через индикаторную трубку диаметром около двух мм с помощью насоса аспирировали 1 или 2  $\text{дм}^3$  воздуха из ротовой полости и оценивали концентрацию аммиака по линейным габаритам индикаторного эффекта (переход желтого цвета адсорбента в фиолетовый или черный). Через капиллярные трубки аспирировали всего лишь 10 или 50  $\text{см}^3$  воздуха. Пассивный дозиметр не требует аспирации, так как состоит из тонкого слоя адсорбента, заключенного между двумя слоями прозрачного полимера, и имеет щель или отверстие с одной стороны для проникновения воздуха. Изменение окраски адсорбента происходит в ходе адсорбции анализируемого компонента газовой смеси исключительно за счет диффузии.

В ходе диагностической процедуры ИТ помещается близко к мягкому небу. Рот остается слегка открытым. В ходе исследования следует предотвратить попадание слюны в ИТ, так как это испортит результат анализа. Воздух просасывается через ИТ из стекла (а лучше из прозрачного полиэтилена внутренним диаметром  $2,0 \pm 0,1 \text{ мм}$ ) заполненную твердым кремниевым адсорбентом кислой природы с нанесенным на него кислотно-основным индикатором. Индикатор должен иметь цветовой переход в кислой области. Концентрацию  $\text{C}_1$  оценивают по длине отличающегося от первоначального по цвету слоя адсорбента индикаторной трубки. Для трубок типа ИТМ—12 (силикагель КСК в качестве адсорбента) 1 мм слоя адсорбента соответствует в пересчете на аммиак

концентрации  $0,3 \text{ мг/м}^3$  при аспирации 2 литров воздуха со скоростью не более 0,4 литра в минуту. Для производимых ООО «Синтана СМ» ИТ- $\text{NH}_3$  (кварцевый песок в качестве адсорбента) 1 мм слоя сорбента соответствует концентрации аммиака ( $C_1$ ) равной  $0,1 \text{ мг/м}^3$  при аспирации 0,02 литров воздуха со скоростью не более 0,2 литра в минуту. Диагностическим критерием при работе с индикаторной трубкой ИТМ-12 (ИТМ-12эо) была принята концентрация аммиака  $C_1 > 0,6 \text{ мг/м}^3$ . При работе с индикаторной трубкой ИТ- $\text{NH}_3$  за диагностический критерий была принята концентрация аммиака  $C_1 > 0,3 \text{ мг/м}^3$ . Модификация, где в качестве антацида принимается раствор бикарбонат натрия ( $0,5\text{--}5 \text{ г}$  питьевой соды в  $30\text{--}50 \text{ мл}$  воды), дает увеличение показателей тестирования в 2–3 раза за счет усиления газового выброса.

Кинетическая методика, которая фигурирует под различными наименованиями (Гелик-тест, ХЕЛИК-тест, УВТ- $\text{NH}_3$ , Helic-тест, Helic-test) предполагает оценку концентрации аммиака в воздухе ротовой полости после приема мочевины  $^{12}\text{C}^{14}\text{N}_2^{16}\text{O}$  нормального изотопного состава, обозначаемого ( $C_2$ ). Детектирование концентрации аммиака после «нагрузки» карбамидом выполняется аналогично измерению  $C_1$ . Для изучения кинетической зависимости она может быть выполнена многократно в течение 30–40 минут. Измерение содержания аммиака в воздухе дыхания может быть выполнено и на приборной основе и пассивными дозиметрами изготовленными, как на основе кремниевых носителей, так и на основе носителей из нетканых материалов или специальных бумаг. Прирост  $C = C_2 - C_1$  зависит от дозы принятой мочевины: чем больше доза, тем больше увеличение. Именно поэтому при рутинных анализах требуется точная дозировка карбамида. Доза в 500 мг оказалась той минимальной, которая уверенно фиксировалась ИТ. То есть это доза, влияющая на размер индикационного эффекта в ИТ, но не вызывающая существенных последствий у пациента. Прирост, превышающий  $0,6 \text{ мг/м}^3$  и  $0,3 \text{ мг/м}^3$ , был выбран в качестве второго диагностического критерия для ИТМ-12 и ИТ- $\text{NH}_3$ , соответственно. Если при выполнении методики УВТ- $\text{NH}_3$  хотя бы один из критериев превышен, то тест на наличие инфекции НР считается положительным. В дальнейшем методика была усовершенствована. В результате усовершенствования методики и тест-систем для диагностики *Helicobacter pylori* был разработан метод быстрого тестирования по аммиаку (УВТ- $\text{NH}_3$ ).

Опыт применения нагрузочной методики позволил модифицировать тест и создать экспресс диагностику хеликобактериоза, позволяющую за 5 минут (вместо 15 минут) провести нагрузочный тест с карбамидом. С этой целью была изменена конструкция всех составляющих элементов индикаторной трубки без изменения её привычного внешнего вида. Радикально была изменена технология изготовления фильтрующих ограничителей. Изменен материал адсорбента-носителя и технология приготовления хемосорбента на его основе. Это повысило чувствительность индикаторной трубки по отношению к аммиаку на три-четыре порядка. Повышение чувствительности позволило сократить объем пробы воздуха, отбираемого через трубку из ротовой полости в 100–150 раз по сравнению с индикаторными трубками ИТМ-12, которые использовались в начале работы в 1992 году. Конструкция модифицированной индикаторной трубки представлена на рис. 3. Процедуру измерения УВТ- $\text{NH}_3$  проводили следующим образом: в течение 1 минуты ИТ- $\text{NH}_3$  измеряли базальную концентрацию аммиака, затем через 3–4 минуты после нагрузки  $0,5 \text{ г}$  карбамида в течение одной минуты определяли повышение уровня аммиака. Прирост окрашенного столба на 3 мм и выше считали положительным результатом анализа на наличие хеликобактера. Чувствительность и селективность для данной методики при использовании индикаторных трубок ООО «Синтана СМ» составляет 95–96 %.

Таким образом, в результате длительной работы большой группы лиц и многочисленных апробаций и внедрений была создана отечественная оригинальная высокоэффективная неинвазивная методика простая в освоении и применении. Это результат научно-исследовательской работы начатой в 1992 году в Санкт-Петербурге и проводимой неформальной группой специалистов различного профиля, работающих над созданием и совершенствованием отечественной медицинской диагностики по составу газовой среды не закончилась и сегодня. В основе этой газоаналитической диагностической методики лежат патенты по способу диагностики и НОУ-ХАУ по изготовлению тест систем. Её исполнение в одном из рабочих вариантов выглядит следующим образом

1. Вставить индикаторную трубку ИТ- $\text{NH}_3$  одним концом в шланг аспиратора (микро компрессор ELITE-801 или 802 модифицированный).
  2. Поместить свободный конец трубки в ротовую полость обследуемого, так чтобы она находилась под углом 45 к небу, но не касалась его.
  3. Воткнуть штепсельную вилку аспиратора в розетку, таким образом включить его (зеленая кнопка — декоративный элемент, она не включает аспиратор).
  4. Засечь время, указанное на корпусе аспиратора при его градуировке. Для трубки ИТ- $\text{NH}_3$  оно составляет 20–30 секунд и зависит от мощности и других рабочих характеристик аспиратора. По истечении этого времени трубку вынуть, а аспиратор выключить.
  5. Вынуть трубку из шланга аспиратора.
  6. Измерить высоту окрашенного столба линейкой (в миллиметрах). Полученное число означает базовую концентрацию аммиака в ротовой полости ( $C_1$ ). Общая погрешность такого измерения 30 %.
  7. Дать обследуемому выпить раствор карбамида: 0,5 грамма (500 мг) карбамида в 10 мл воды. Обязательно дать пациенту запить раствор карбамида 10 мл чистой воды.
  8. Спустя  $3,0 \pm 0,2$  минуты вновь вставить трубку в шланг аспиратора тем концом, который был свободен при первом измерении. Поместить конец трубки в ротовую полость под углом 45 к небу, так, чтобы трубка не касалась его.
  9. Вторично выполнить п.п. 3–6.
- Полученное число означает нагрузочную концентрацию аммиака в ротовой полости в ( $C_2$ ).
1. Вычтё из  $C_2 - C_1$ . Полученное число означает нагрузочную концентрацию аммиака в ротовой полости в ( $C$ ). Если приростом нельзя пренебречь, то есть он более 2 мм, то инфицирование НР присутствует. Для точной оценки можно воспользоваться номограммой и выполнить п.п. 11–13 инструкции.
  2. Отметить на номограмме (рис. 1) точку по вертикальной оси и точку по горизонтальной оси.
  3. Отметить точку пересечения линий параллельных осей из этих точек.
  4. Оценить полученный результат по номограмме: Если точка пересечения лежит вне сектора эллипсов с центром в начале ко-

ординат, то инфицирование НР несомненно. Если точка пересечения лежит в секторе первого эллипса, то есть вблизи от начала координат, то отсутствие инфицирования хеликобактером несомненно.

**ПРИМЕЧАНИЕ:**

♦ В упрощенном варианте оценки можно не измерять базальную концентрацию аммиака и не выполнять пункты 4-6 и 11-13, а после пункта 3 сразу приступить к п. 7.

♦ В случае высокой базальной концентрации ( $C_1$  превышает 4 мм) тест на НР считается положительным и нагрузочное измерение можно не проводить, то есть методика сводится к методике методика «АЭРОТЕСТ»). Пациента нужно обследовать и на лямблии (L) если показатели теста находятся в «красной» зоне.

♦ В том случае, когда тест применяется для корректировки терапии в ходе её проведения, положительным терапевтическим воздействием можно считать негативный тест через неделю после приема назначенных препаратов. В противном случае схему лечения следует изменить (усилить).

**В тоже время при подготовке к проведению и проведению аналитической диагностической процедуры для того, что бы исключить влияние субъективных факторов на результаты теста при проведении первичной диагностики хеликобактериоза или оценке результатов терапии следует иметь ввиду следующее:**

♦ Не следует принимать пищу минимум три часа до проведения теста.  
♦ Не следует употреблять некоторые медикаменты и пищевые добавки; особенно те, которые влияют на активность бактерии и используются для её эрадикационной терапии:

• лекарственные препараты и пищевые добавки, содержащие тяжелые металлы, и в первую очередь препараты на основе солей **висмута** и **серебра** в срок до 4-х недель до проведения теста.

• **антибиотики** и **антисекреторные** средства в течении 2-х недель до проведения теста.

• **анальгетики** в течение 5 дней.

• **противовоспалительные** или **антацидные** препараты в течении в течение 3 дней.

• продукты питания и пищевые добавки, содержащие бактериальные культуры или фаги, и в первую очередь кисломолочные продукты, содержащие **бифидо-** и **лакто-** бактерии за 1-2 дня до проведения анализа.

• лекарственные средства и пищевые добавки, обладающие **антисептическими** свойствами, включая экстракты лекарственных растений, например экстракт **подорожника**, в течение 4-5 дней до проведения анализа.

♦ Нельзя употреблять спиртные напитки или содержащие **алкоголь** жидкости, включая пищевые добавки и экстракты растений, в течение одних суток до обследования.

♦ Не следует употреблять **минеральную** воду, содержащую соли тяжелых металлов и в первую очередь соли мышьяка, в течение 2-х недель до проведения теста. Следует исключить употребление любой минеральной воды за 2-3 дня до проведения теста.

♦ Не желательна употреблять в пищу бобовые (**фасоль, бобы, горох, соя**) в течение одних суток перед проведением обследования.

♦ Нельзя употреблять препараты, целенаправленно искажающие работу средств газоаналитического контроля, например **«Антиполицай»**, или препараты на основе **унигиола**, как минимум за 1-2 дня до проведения анализа.

♦ Не следует употреблять в пищу продукты, содержащие уксусную, молочную, лимонную, щавелевую или аскорбиновую кислоту, а так же другие **органические кислоты** и в первую очередь легколетучие, за 1-2 дня до проведения анализа.

♦ Нельзя употреблять **газированные** и **щелочные** напитки за 2-3 часа до обследования.

♦ Нельзя **курить** непосредственно перед обследованием. Рекомендуется прекратить курение за 2-3 часа до проведения обследования.

♦ Рекомендуется почистить зубы и тщательно прополоскать рот водой перед обследованием.

Таким образом, для того, что бы получить достоверные диагностические результаты:

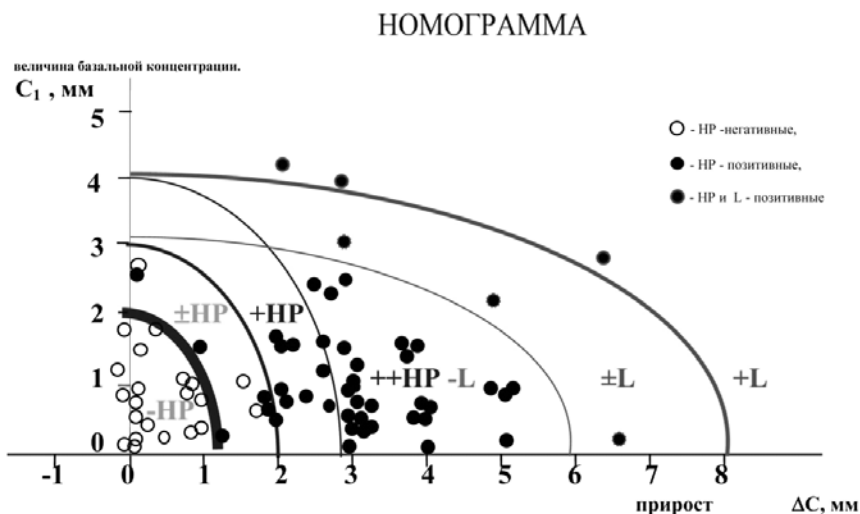
♦ Обследование проводится натощак, не менее чем через 3-и часа после приёма пищи.

♦ Обследование проводится в проветриваемом помещении. Для его санитарной обработки не следует использовать моющие средства содержащие аммиак.

♦ Рот пациента на протяжении всего анализа должен быть приоткрыт. Трубка должна отбирать воздух из зоны около верхнего нёба. Слюна не должна попадать в индикаторную трубку. Пациент должен дышать равномерно и не должен дуть в трубку.

♦ Для приготовления раствора карбамида и ополаскивания рта следует использовать только питьевую воду. Ни в коем случае нельзя использовать для этой цели минеральную воду.

♦ Строго придерживаться времени экспозиции (**3 минуты**) после приёма раствора карбамида.



**Рис. 1. Номограмма оценки результатов по методике.**