

В.Е. Милейко
ООО «Синтана СМ», г. Санкт-Петербург

Развитие неинвазивных UBT-NH₃ методик диагностики Helicobacter Pylori

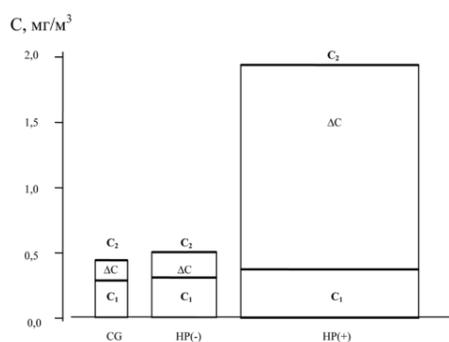
В 1992 г. в С.-Петербурге возникло самостоятельное направление «дыхательной» диагностики (UBT-NH₃) для подтверждения Helicobacter pylori (HP) зависимых заболеваний. Его родоначальником была неоправданно забытая методика «Аэротест» [1]. Метод (методика «Аэротест») был разработан НИИ Эпидемиологии и микробиологии им. Пастера совместно с СТ «Синтана Прозум» с целью неинвазивной диагностики язвенной болезни ассоциированной HP [2]. Метод основан на измерении равновесного содержания аммиака в воздухе ротовой полости индикаторными трубками (ИТ). В методике «Аэротест» применялись индикаторные трубки ИТМ-12, ранее использовавшиеся только для контроля содержания воздуха в отсеках обитания объектов ВМФ. Они позволяют достоверно оценить концентрацию аммиака в интервале 0,04 до 4,0 мг/м³ в условиях высокой влажности при температуре около 36°C.

Для того чтобы предотвратить попадание слюны при выполнении измерений по методике «Аэротест», ИТ помещается в рот открытым концом близко к мягкому нёбу, а рот остается приоткрытым. Контакт с нёбом не допустим. Дыхание обследуемого человека должно быть равномерным и спокойным. Дуть в трубку и закрывать рот нельзя. Воздух просасывается через ИТМ-12, ИТМ-12м или ИТМ-12эо (СТ «Синтана Прозум») диаметром 2,0±0,1 мм, заполненную твердым кремниевым адсорбентом кислой природы (силикагель КСК) с нанесенным на него кислотнo-основным индикатором в качестве хромогенного вещества с цветовым переходом в кислой области. Равновесную (базальную) концентрацию аммиака C₁ оценивают по длине отличающегося от первоначального по цвету слоя адсорбента индикаторной трубки. При этом 1 мм слоя адсорбента, изменившего цвет, соответствует в пересчете на аммиак концентрации 0,3 мг/м³ при аспирации 2 литров воздуха со скоростью 0,4 литра в минуту. Диагностическим критерием при работе с индикаторной трубкой ИТМ-12эо была

принята концентрация аммиака C₁ > 0,6 мг/м³. Содержание аммиака в воздухе ротовой полости выше этой величины свидетельствовало о эрозивно-язвенных процессах в активной фазе, причем в абсолютном большинстве своем ассоциированных с HP по данным бактериологического анализа.

Рис. 1.
Средняя концентрация аммиака в воздухе ротовой полости обследуемых детей, где CG – контрольная группа (n=21 человек), HP(-) – группа HP-отрицательных больных (n=46 человек), HP(+) – группа HP-положительных больных (n=157 человек), C₁ – средняя концентрация до приема мочевины, C₂ – средняя концентрация после приема мочевины, ΔC – средняя величина прироста концентрации после приема мочевины.

ИЗМЕРЕНИЯ ПОЛУЧЕНЫ В 1995 ГОДУ Е.А. КОРНИЕНКО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИТМ-12



Следует заметить, что ИТ – это надежный одноразовый высокочувствительный линейный газоанализатор. Конструкция ИТ и природа адсорбента определяют, какой состав анализируемых веществ контролируется и как он измеряется. Исходя из характеристик и назначения ИТМ-12, этот одноразовый газоанализатор оказался полностью пригодным для анализа выдыхаемого человеком воздуха или воздуха его ротовой полости. Его недостатками для широкого применения в диагностической методике был стеклянный корпус изделия и большой объем (от 4 до 4,5 литров), отбираемой через ИТ, пробы анализируемого воздуха. Поэтому развитие метода состояло

Рис. 2.
Изменение содержания аммиака в воздухе ротовой полости у HP-положительного больного после приема 500 мг мочевины, где C – средневзвешенная концентрация аммиака за 3 минуты пробоотбора, BL – базальный уровень, ST – момент завершения приема мочевины.

ИЗМЕРЕНИЯ ПОЛУЧЕНЫ В 1995 ГОДУ Е.А. КОРНИЕНКО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИТМ-12

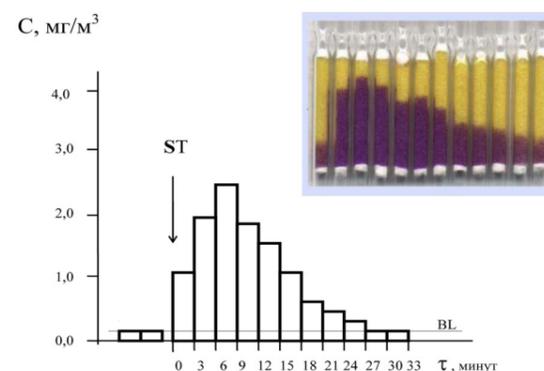
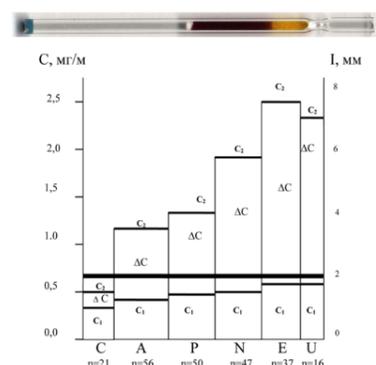


Рис. 3.
Среднее значение концентрации аммиака в воздухе ротовой полости детей с гастродуоденальной патологией: C – контрольная группа (n=21 человек), А – антральный гастрит (n=56 человек), Р – распространенный гастрит (n=50 человек), N – нодулярный гастрит (n=47 человек), E – эрозивный гастрит (n=37 человек), U – язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки (n=16 человек), где C₁ – базальная концентрация, C₂ – концентрация после приема мочевины, ΔC – средний прирост концентрации после приема мочевины, ——— норматив "Аэротест" [2], I – линейный размер индикационного прироста ΔC, мм

ИЗМЕРЕНИЯ ПОЛУЧЕНЫ В 1995 ГОДУ Е.А. КОРНИЕНКО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИТМ-12



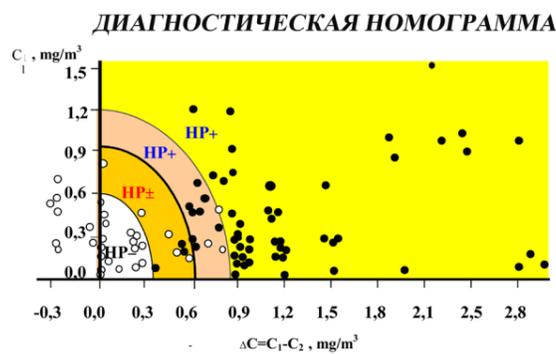
в улучшении конструкции ИТ и совершенствовании методик медицинского применения. Уже к началу века была создана группа кинетических методик диагностики НР с нагрузкой карбамидом [3, 4]. Эти родственные методики в качестве основной диагностической задачи имели другую цель: определение наличия в организме инфекции НР и оценка степени ее инвазии. Аналитическим откликом в методике UBT-NH₃ является средняя концентрация аммиака и родственных ему веществ (С) за время Δt (рис. 1, 2) [4]. Кинетическая методика UBT-NH₃ предполагает оценку изменения концентрации аммиака в воздухе ротовой полости после приема мочевины ¹²C¹⁴N₄¹⁶O нормального изотопного состава, обозначаемого (С₂). Детектирование концентрации аммиака после «нагрузки» карбамидом выполняется аналогично измерению С₁. Для изучения кинетической зависимости она может быть выполнена многократно в течение 30-40 минут (рис. 3) [4]. Прирост ΔС = С₂-С₁ зависит от дозы принятой мочевины: чем больше доза, тем больше увеличение [5]. Именно поэтому при рутинных анализах требуется точная дозировка карбамида. Доза в 500 мг оказалась той минимальной, которая уверенно фиксировалась ИТ, т.е. как доза влияющая на размер индикационного эффекта в ИТ, но не вызывающая существенных последствий у пациента.

Из отечественных UBT-NH₃ методик можно выделить три основных варианта.

Первый из них это «Гелик-тест» (название методики по одной из первых публикации [5] авторов метода), или ХЕЛИК-тест (авторское название методики, предложенное теми же авторами). В первоначальном варианте разработчиков «Гелик-тест» (ХЕЛИК-тест) предполагает измерение трубкой ИТМ-12 (адсорбент желтого цвета, стеклянный корпус), а в дальнейшем трубкой ИТМ-12Эо (адсорбент желтого цвета, полипропиленовый корпус; разработчик ИТ и производитель до 1997 года СТ «Синтана Прозум», производитель с 1998 по 2000 г. ООО «АМА», с 1999 года по настоящее время ООО «Синтана СМ») базальной концентрации аммиака в воздухе ротовой полости (С₁) за время 500±200 с, дальнейший прием 0,5 г карбамида в виде 5%-ного водного раствора и измерение через 400±100 с концентрации содержания аммиака в воздухе ротовой полости после «нагрузки карбамидом» (С₂) за время 500±200 с. Для улучшенной оценки диагностических результатов авторами методики была предложена номограмма (рис. 4) [5].

Рис. 4. Номограмма диагностической оценки результатов анализа содержания аммиака в воздухе ротовой полости выполненных ИТМ-12Эо по методике Гелик-тест (ХЕЛИК-тест) [4,5].

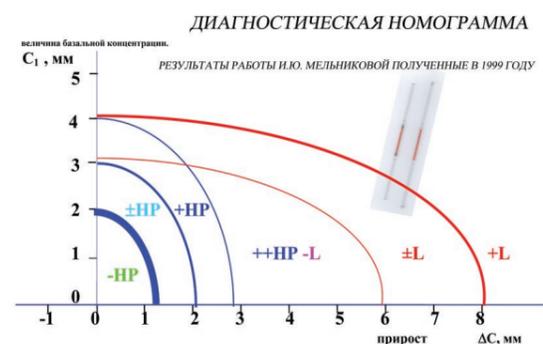
ИЗМЕРЕНИЯ ПОЛУЧЕНЫ В 1995 ГОДУ Е.А. КОРНИЕНКО С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ИТМ-12



В дальнейшем с накоплением диагностических результатов, полученных И.Ю. Мельниковой, и анализом экспериментального материала в 1999 году время экспозиции после приема карбамида и время отбора пробы при использовании индикаторных трубок типа ИТМ-12Эо удалось сократить до 180 ± 10 с и 300 ± 60 с, соответственно.

С 1999 по 2002 год ООО «АМА» выпускала аналог ИТМ-12Эо под названием ХЕЛИК-тест, то есть с названием одноименным с диагностической методикой. Трубка ХЕЛИК-АМА по своим характеристикам несколько уступала варианту ИТМ-12Эо из-за конструкции ограничителей. По адсорбенту, она, как и ИТМ-12Эо, была полным аналогом стеклянной ИТМ-12. В 2002 году ООО «АМА» прекратило свою деятельность. Организованная в 2002 году ООО «Ассоциация медицины и аналитики» (сокращенно ООО «АМА») выпускает улучшенный аналог трубки ИТМ-12Эо – индикаторную трубку ХЕЛИК, ориентированную на выполнение методики ХЕЛИК-тест (Гелик-тест) [3-5] в усовершенствованном варианте с укороченной экспозицией после приема мочевины (карбамида). Трубки, выпускавшиеся до 2010 года ООО «Ассоциация медицины и аналитики», имели в качестве наполнителя адсорбент на основе силикагеля, окрашенного в желтый цвет хромогенным индикатором Бромфеноловым синим, а в качестве ограничителей использовались «звездочки» из полиэтилена высокого давления ПВД. В силу чего, корпус ИТ обязательно должен быть запаян для хранения. С 2010 года ООО «Ассоциация медицины и аналитики» выпускает ИТ для методики ХЕЛИК-тест в одноименном варианте, но с новым адсорбентом на основе того же хромогенного индикатора. Однако, теперь в качестве ограничителей используется слой из волокнистого материала, закреп-

Рис. 5. Номограмма оценки результатов, где – НР – негативные, +НР – позитивные, +L – позитивные (совместное присутствие НР и Лямблий); ΔС – прирост концентрации аммиака в воздухе ротовой полости пациента, С₁ – базальная концентрации аммиака в воздухе в миллиметрах столба адсорбента изменившего окраску.



пленного деформированными кольцами изготовленными из ПВД. Трубки выпускаются в запаянном варианте отличии от аналога ИТМ-12Эо (производитель ООО «Синтана СМ»), где запайка для хранения не требуется из-за использования в качестве ограничителей диффузионных фильтров из пространственно ориентированного волокнистого материала.

Второй по времени разработки является усовершенствованная методика UBT-NH₃ с использованием ИТ-NH₃ (ООО «Синтана СМ»): измерение С₁ за 60 ± 10 с, нагрузка карбамидом (0,5 г 5%-ного раствора), измерение через 150-180 с С₂ за 60 ± 10 с.

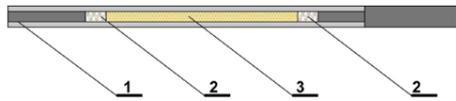
Для ИТ-NH₃ образца 1999 г. (кварцевый песок в качестве адсорбента) 1 мм слоя сорбента соответствует концентрации аммиака (С₁) равной 0,1 мг/м³ при аспирации 0,2 литров воздуха со скоростью 0,2 литра в минуту. В дальнейшем характеристики ИТ-NH₃ были улучшены. Трубка выпускается ООО «Синтана СМ» с диффузионными фильтрами в качестве ограничителей, и храниться три года без изменения характеристик при НКУ в не запаянном варианте.

Последняя, третья методика, это способ оценки уреазной активности ротовой полости: предполагает только ополаскивание ротовой полости 5%-ным, а лучше 20%-ным раствором карбамида (10-15 мл), и измерение С₂ через 30-120 с за время 60 ± 10 с трубками ИТ-NH₃.

Промежуточной является методика с использованием жевательной резинки содержащей карбамид [6].

Результаты первоначальных исследований, полученные при обследовании более двух

Конструкция индикаторной трубки ИТ- NH_3 -
второе поколение



- 1 - корпус (полипропилен высокого давления экструдированный);
2 - фильтрующие ограничители (флокированная нить);
3 - хемосорбент (розовый крупнокристаллический гидротермальный низкотемпературный крупнопористый кварц с размером сферических зерен 0,20-0,25 мм кислотной обработки с нанесенным на поверхность сфер Бромфеноловым синим).

тысяч человек в возрасте от 3,5 до 18 лет, свидетельствуют о высокой чувствительности и селективности всех методик (96-97%) по сравнению с другими методами, в частности гистологическими исследованиями.

Дальнейшее совершенствование ИТ- NH_3 позволило сократить время отбора пробы через ИТ электромеханическим аспиратором до 30 с., а затем 15-20 с. На сегодня существует вариант методики, где отбор пробы воздуха (аспирация) осуществляется через ИТ- NH_3 (ТУ 2291-50042073-001-2012) медицинским шприцем. При этом объем пробы составляет всего 20 мл. Дальнейшее усовершенствование ИТ уже позволило сократить объем отбираемой пробы до минимально оправданного количества равного 5 мл, но такое увеличение чувствительности несколько сокращает хранимость изделия и пока не оправдано.

Например, усовершенствованная методика в последнем варианте выглядит следующим образом:

Индикаторную трубку ИТ- NH_3 (ИТ NH_3) вставить в соединительный шланг и соединить со шприцем на 5 мл. Поместить свободный конец индикаторной трубки в ротовую полость обследуемого пациента (ближе к нёбу). Ото-

брать шприцем через индикаторную трубку 5 ± 1 мл воздуха из ротовой полости. При этом следить, чтобы слюна не попала в индикаторную трубку. После отбора пробы воздуха оценить индикационный эффект (размер синего столба) по шкале или измерить его линейкой в мм. Затем дать пациенту 10 мл 5%-ного водного раствора карбамида (0,5 г) и 10 мл воды – запить. Через 3 минуты повторить процедуру измерения другой стороной индикаторной трубки или другой трубкой. Оценить индикационный эффект, как изложено выше, и оценить прирост содержания аммиака.

Если прирост будет превышать один мм линейного размера столба адсорбента, то есть $0,3 \text{ mg/m}^3$, то тест на *Helicobacter pylori* считается положительным.

Для более точной оценки состояний, близких по показателям к величине оценочного критерия, следует пользоваться номограммой с учетом величины базальной концентрации.

Аналитическая процедура может быть выполнена повторно через 45-50 минут.

При попадании слюны в тест-трубку процедуру отбора воздуха следует прекратить незамедлительно, тест заменить и выполнить повторный анализ безотлагательно.

Метод «Аэротест» также не утратил своего значения и сегодня потому, что измерение C_1 органически входит в состав всех методик. Именно по C_1 целесообразно контролировать течение эрозивно-язвенного (ЭЯ) процесса. Измеренная ИТМ-12эо, $\text{C}_1 > 0,3 \text{ mg/m}^3$ всегда указывает на наличие ЭЯ состояния в активной фазе воспалительного процесса. Кроме того, высокие значения C_2 указывают на совместное инфицирование лямблиями (L) и НР (рис. 5).

Дифференцированное применение методик позволяет надежно выявлять НР, сочетанное инфицирование *Lambliia* (*Gadinella* *intestinalis*), верифицировать эрозивно-язвенное состояние, и контролировать эффективность терапии.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Сафонова Н.В., Жебрун А.Б. Гастрит, язвенная болезнь и хеликобактериоз. Рекомендации для врачей. - СПб, 1993. - 40 с.
2. Жебрун А.Б., Сафонова Н.В., Довгаль С.Г., Милейко В.Е., Фаловский М.В. Патент РФ № 2091796 от 27.05.1993 «Способ диагностики хеликобактериоза».
3. Корниенко Е.А., Милейко В.Е. «Новый метод неинвазивной диагностики хеликобактериоза». Диагностика и лечение. - Архангельск, 1996, II(12). - С 31-33.
4. Корниенко Е.А., Милейко В.Е. Патент РФ № 2100010, А 61 В 10/00, С 12 Q 1/58, «Способ неинвазивной хеликобактериозадиагностики ин vivo», опубл. 27.12.97. - Бюл. № 36.
5. Корниенко Е.А., Милейко В.Е. Гелик-тест - неинвазивный метод диагностики хеликобактериоза. - Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колонопроктологии. - № 6. - 1998. - С. 34-37.
6. Корниенко Е.А., Григорян Т.М., Милейко В.Е. Комплекс методик для диагностики инвазии *Helicobacter pylori*. - 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.