НЕИНВАЗИВНАЯ ДИАГНОСТИКА ХЕЛИКОБАКТЕРИОЗА ИНДИКАТОРНЫМИ ТРУБКАМИ

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

В Санкт-Петербурге 28 мая 2012 года состоялась объединенная научная Сессия Научного общества гастроэнтерологов России, Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова и Центрального НИИ гастроэнтерологии. Сессия называлась «ПИОНЕРЫ ХЕЛИКОБАКТЕРИОЗА». Она была посвящена современной оценке проблем, связанных с терапией хеликобактериоза и других гастродуоденальных паталогиий.

В заглавном докладе Helicobacters Pioneers австралийский профессор B. Marsnall (Рис.1) рассказал о своем трудном пути к Нобелевской премии. В качестве свидетельства борьбы с консерватизмом он привел текст письма с отказом в публикации его открытия в 1993 году. При этом он забыл напомнить, что следующая его статья (первая из опубликованных на эту тему) несколько лет валялась в редакции журнала Lancet без движения. В своем докладе он справедливо заметил, что развитие науки состоит главным образом в разрушении общепризнанных научных и лженаучных иллюзий. Примеры он приводить не стал. Виновник хеликобактерной революции в гастроэнтерологии сосредоточился на пояснении современного состояния вопроса. При этом он отметил, что распространенность Helicobacter pylori (HP) в западной Австралии у пациентов, страдающих гастродуоденальными заболеваниями, не превышает 20%.

В следующем докладе один из «пионеров хеликобактериоза» американский профессор David Peura, осветил некоторые возможные проблемы, связанные с применением ингибиторов протонной помпы. В другом своем докладе D. Peura отметил весьма интересный факт: его сегодня больше заботят проблемы диспепсии, нежели хеликобактериоза, так как в его родном городе в штате Вирджиния, только у 10% пациентов, обратившихся в клинику, обнаруживается HP.

Следует заметить, что с момента открытия этиопатогенной роли Helicobacter pylori в гастродуоденальных заболеваниях [1] прошло более 25 лет. Осознание проблемы и создание современных высокоэффективных методов диагностики, терапии и контроля терапии состоялось и, как видно из докладов «пионеров хеликобактера», во многих странах терапия хеликобактериоза увенчалась успехом.

В противоположность этому в докладе «Особенности инфекции Helicobacter pylori в России на современном этапе» профессор А.Б. Жебрун (НИИЭиМ им. Пастера, Санкт-Петербург) отметил, что в России все обстоит по-другому. В последнем десятилетии прошлого века контингент обследованных детей в Санкт-Петербурге и Уфе, как следует из материала его доклада, был инфицирован к подростковому возрасту на 70-80%. Одновременно инфицирование взрослых в этих городах составляло 40-60%. Прошло десять лет. Эти дети выросли, но, судя по аналогичному проценту инвазии HP в следующей по возрасту группе населения (70-80%), остались инфицированными, как следует из доклада директора НИИ, в том же проценте. При этом средний процент в среде подростков и детей снизился до 30-60% в зависимости от возрастной группы. Таким образом, из доклада следует, что на сегодняшний день с повышением уровня жизни процент инфицированности детей понизился. Однако в массе ранее инфицированных тотальной терапии не проводилось, и сегодняшние половозрелые и активные члены общества в возрасте от 20 до 40 лет на настоящий момент являются резервуаром инфекции HP. Подобное пренебрежительное отношение к своему здоровью, на мой взгляд, связано с тотальным непониманием проблемы обществом в целом. Отсутствие терапии хеликобактериоза, как в детском возрасте, так и в дальнейшем, приведет к известным последствиям. Уже в ближайшие 10 лет мы должны будем увидеть у лиц, длительно инфицированных HP, онкологические заболевания и тяжелые формы язвенной болезни.

Рис.1.
Барри Маршалл выступает в стенах Северо-Западного государственного медицинского университета им. И.И. Мечникова с докладом о проблемах хеликобактериоза (фото сделано Георгием Крыловым).

Из этого и других российских докладов предельно ясно, что предлагаемая терапия всех уровней уже в 20% случаев фактически не эффективна, при этом резистентность к антибиотикам и вирулентность штаммов HP только растет, а желание лечиться у пациентов только падает.

В чем же причина Российской ситуации? Ведь у нас в наличии есть все необходимые компоненты для решения терапевтической задачи, причем даже более эффективные, чем у наших австралийских и американских коллег. Это показал один из вопросов по докладу, прозвучавший из зала: «Нужно ли во всех случаях проводить эрадикацию HP, если его присутствие диагностически подтверждено?» Нобелевский лауреат тонко заметил: «Зачем проводить диагностику, если не собираетесь лечить?». Точно такой же вопрос я лично слышал еще 20, 15 и 10 лет назад на таких же престижных форумах в Санкт-Петрбурге в присут-

ствии не менее именитых зарубежных и российских коллег приверженцев эрадикации HP в ходе терапии. По этому поводу могу сказать только следующее: победа над хеликобактером в желудках наступит только после победы над хеликобактером в головах.

Вышеизложенные обстоятельства стимулировали меня опубликовать научную статью в историческом аспекте по ранее выполненным результатам исследований в области создания отечественной неинвазивной методики диагностики хеликобактериоза пригодной для контроля и корректировки терапии, так как эта публикация, возможно, поможет лучше осознать проблему диагностики хеликобактериоза широкому кругу лиц и, следовательно, организовать эффективную и своевременную терапию

Признание в 1994 году Международным агентством по изучению рака (IARK) инфекции HP в качестве канцерогена первого порядка и принятие Маастрихтских рекомендаций по диагностике и лечению инфекции Helicobacter pylori явилось новым толчком к развитию диагностических методов. Диагностика HP, показания и способы лечения этой инфекции являются актуальной практической задачей. На сегодняшний день создано большое число инвазивных и неинвазивных методик на основе применения различных химических, биохимических и физико-химических методов с использованием аналитического оборудования самого последнего поколения. Особое место в ряду диагностических методов занимает уреазный «дыхательный тест» с нерадиоактивным изотопным углеродным маркером, который благодаря развитию приборостроения успешно прогрессирует. Доступность радиоуглеродного, изотопного и газового анализа и газоаналитических тестов позволила использовать аналогичные подходы в диагностике метаболизма химических веществ, фенилкетонурии, ацетонемий и сахарного диабета, раннего рака и широкого спектра бактериальных инфекций, панкреатита, разных звеньев углеводного обмена в организме человека. Создана большая группа надежных неинвазивных высокочувствительных методик, конкурирующих между собой на альтернативной основе.

В этой публикации предпринята попытка подробно осветить только неинвазивный метод диагностики HP, построенный на биохимической основе не связанный с применением изотопных маркеров. Этот биохимический подход построен на уникальной способности HP синтезировать в ходе жизнедеятельности большое количество высокоактивной уреазы. Данное свойство HP и используется для эффективной и селективной диагностики этого микроорганизма, так как именно оно выделяет HP из числа других бактерий, в том числе, и из числа бактерий уреазопродуцентов. Уреазой называется фермент, селективно гидролизующий мочевину. Эта ферментативная реакция является классической. Ее кинетика детально изучена для ферментов различного происхождения. Хорошо изучено влияние pH среды и различных ингибиторов уреазы (солей металлов, таких как висмут, серебро, золото; органических ингибиторов), как in vitro, так и in vivo.

Важным фактором, который учитывался при создании отечественных методик и тест систем для классической диагностики HP, является малая зависимость от уровня самой техники. В связи с этим были созданы одноразовые адсорбционные тест-системы. При существующей высокой технологии изготовления их аналитическая чувствительность существенно превышает чувствительность первичных датчиков большинства физико-химических методов, за исключением ион-дрейфовой спектрометрии. Для анализа воздуха, выдыхаемого человеком (воздуха ротовой полости), который является весьма непростым объектом для газового анализа по сравнению с воздухом атмосферы и воздухом рабочей зоны, применены сенсоры на основе хемосорбентов. Наиболее простые из них: линейно-колористические индикаторные трубки для анализа аммиака.

В основе самой методики «дыхательной диагностики» по содержанию аммиака в воздухе ротовой полости лежит изменение pH реакционной среды в ходе удаления из нее продуктов гидролиза карбамида (субстрата). Гидролиз интенсивно протекает под действием фермента (уреазы HP), продуцируемого этими микроорганизмами в огромном количестве.

Методика выполняется in vivo по газообразным продуктам реакции гидролиза карбамида в выдыхаемом воздухе (воздухе ротовой полости) и позволяет оценить характер инвазии HP. Следует отметить, что сведения о константах гидролиза аммонийных солей, как и сам принцип Ле-Шателье, предполагали наличие аммиака в газовой фазе даже над растворами с pH 3-4. Проживание HP колониями изменяет pH в зоне обитания бактерий до 7,8-8,4. Кроме того, известно, что аммиак присутствует в выдыхаемом через нос и рот воздухе и эти параметры различаются у людей в соответствии с их возрастом и состоянием здоровья. Известны и среднестатистические концентрации. Исходя из этого, довольно быстро удалось найти связь между инфицированностью HP и 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. Связь содержания аммиака с наличием аммонийных солей в желудке подтверждалась к тому же приемом антацидов, например бикарбоната натрия – питьевой соды, но наводила на мысль о зависимости от pH желудочного содержимого. Прослеживалось снижение содержания аммиака после приема алкоголя, антисептиков или терапевтического воздействия по принятым на тот момент схемам лечения. В 1992-1993 году была разработана оригинальная методика, которая под названием «Аэротест» получила ограниченное распространение в качестве метода диагностики HP. По этой методике в период с 1992 по 1996 год было обследовано не менее 25 тысяч человек с весьма удовлетворительным результатом. Попытки внедрить «Аэротест» в педиатрическую практику были неоднозначны. Именно это обстоятельство способствовало разработке нагрузочного теста, предполагающего прием пациентом раствора карбамида нормального изотопного состава, который был назван авторами-разработчиками ХЕЛИК-тест (ГЕЛИК-тест в версии первой публикации).

Контроль за изменением содержания аммиака в воздухе ротовой полости с учетом базальной концентрации является вполне надежной высокочувствительной и селективной методикой. Методика может быть выполнена не только индикаторными трубками, но и на любой другой при-

борной базе, позволяющей измерять содержание аммиака при температуре 25-37°С в присутствии водного аэрозоля на уровне от 0,3 мг/м^3. Для этой цели пригоден, например иондрейфовый спектрометр высокого разрешения. Хотя метод с его использованием не получил широкого распространения, но сама его опытная эксплуатация показала надежность метода и позволила получить ряд ценных результатов. Так, например, сравнение результатов анализа отсекаемого альвеолярного воздуха и усредненной пробы «вдох-выдох» показывает бессмысленность усложнения конструкции приборов и методики.

Дальнейшее совершенствование методики было направлено на снижение уровня гипераммониемии, связанной с приемом карбамида пациентами с высоким уровнем инвазии HP, усложнением контрольной и нагрузочной схемы с целью еще большего повышения селективности и чувствительности методики. Предлагаются и различные формы приема карбамида (быстрорастворимые гранулы, жевательная резинка).

Атравматичные дыхательные пробы обычно проводятся после «нагрузки» карбамидом. Если уреаза HP присутствует в желудке, карбамид (мочевина) быстро гидролизуется, образуя аммиак и углекислый газ. Углекислый газ может быть обнаружен в выдыхаемом воздухе, если мочевина, принимаемая перорально, мечена радиоактивным ^{14}C, или устойчивым ^{13}C.

В методике «Аэротест» нами использовался другой подход, построенный на определении равновесной (базальной) концентрации аммиака в выдыхаемом воздухе (C_1). В дальнейших исследованиях определение концентрации аммиака (0,01–3,0 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 от 30 секунд до 5 минут в зависимости от применяемого теста. Через индикаторные трубки диаметром 2 мм с помощью насоса аспирировали 1 или 2 дм^3 воздуха из ротовой полости и оценивали концентрацию аммиака по линейным габаритам индикационного эффекта (переход желтого цвета адсорбента в фиолетовый или черный). Через капиллярные трубки аспирировали всего лишь 10 или 50 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, а массоперенос осуществляется исключительно за счет диффузии.

Индикаторная трубка (ИТ) помещается близко к мягкому небу, рот остается слегка открытым, чтобы предотвратить попадание в нее слюны. Воздух просасывается через индикаторную трубку из стекла или прозрачного полиэтилена внутренним диаметром 2,0 ± 0,1 мм, заполненную твердым кремниевым адсорбентом кислой природы с нанесенным на него кислотно–основным индикатором с переходом в кислой области. C_1 оценивают по длине отличающегося от первоначального по цвету слоя адсорбента индикаторной трубки. Нами использовались два вида индикаторных трубок: ИТ–NH_3 и ИТМ–12эо (производство «Синтана СМ», СПб). Для ИТМ–12эо (силикагель КСК в качестве адсорбента) 1 мм слоя адсорбента соответствует в пересчете на аммиак концентрации 0,3 мг/м^3 при аспирации 2 литров воздуха со скоростью не более 0,4 литра в минуту. Для ИТ–NH_3 (кварцевый песок в качестве адсорбента) 1 мм слоя сорбента соответствует концентрации аммиака (C_1), равной 0,1 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–12эо была принята концентрация аммиака $C_1 > 0,6$ мг/м^3. При работе с индикаторной трубкой ИТ–NH_3 за диагностический критерий была принята концентрация аммиака $C_1 > 0,3$ мг/м^3. Модификация, где в качестве антацида перорально принимается бикарбонат натрия (0,5-5г), дает увеличение показателей тестирования в 2-3 раза за счет усиления газового выброса.

Кинетическая методика ХЕЛИК-тест (Гелик-тест, UBT–NH_3, Helic–тест, Helic-test [2]) предполагает оценку концентрации аммиака в воздухе ротовой полости после приема мочевины $^{12}C^1H_4{}^{14}N_2{}^{16}O$ 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. Но в основе нашей работы лежат данные полученные, главным образом, индикаторными трубками с силикатными адсорбентами. У пациентов, инфицированных HP, прирост $C = Cf(\tau)$ описывается статистическим распределением вида $y = (e^{-ax2})x^2$. Теоретическая модель процесса представлена на рис. 2. 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, т.е. как доза, влияющая на размер индикационного эффекта в ИТ, но не вызывающая существенных последствий у пациента. Прирост, превышающий 0,6 мг/м^3 и 0,3 мг/м^3, был выбран в качестве второго диагностического критерия для ИТМ–12эо и ИТ–NH_3, соответственно. Если при выполнении методики UBT–NH_3 хотя бы один из критериев превышен, то тест на на-

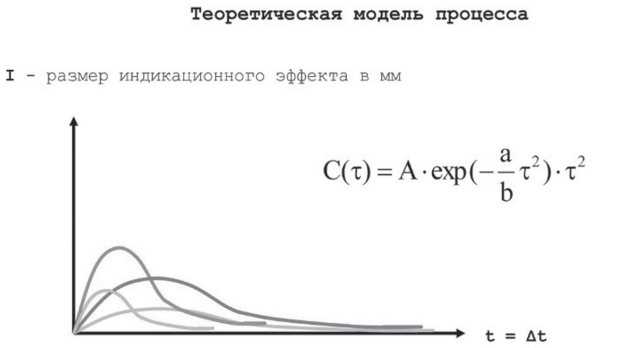

Рис. 2.
Теоретическая модель процесса.
Модель предполагает наличие последовательности процессов выделения группы близких по химической природе веществ.

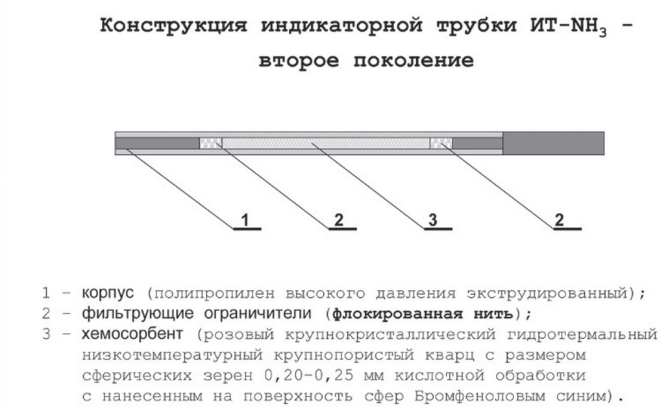

Рис. 3.
Схема индикаторной трубки.

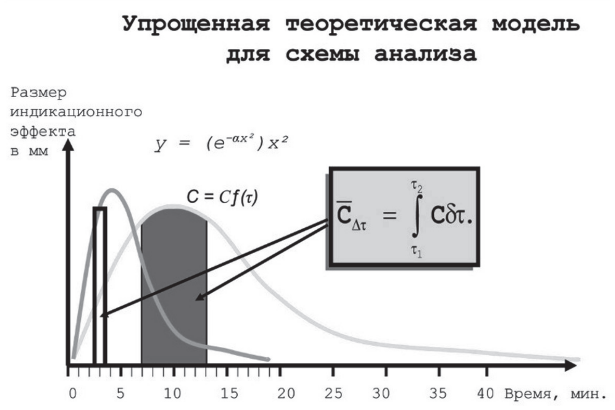

Рис. 4.
Упрощенная теоретическая модель диагностического подхода.

личие инфекции HP 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 (UBT-NH_3).

Опыт применения нагрузочной методики позволил модифицировать тест [3] и создать экспресс диагностику HP–инвазии, 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 ее 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 UBT-NH_3 проводили следующим образом: в течение одной минуты ИТ-NH_3 измеряли базальную концентрацию аммиака, затем через 3-4 минуты после нагрузки 0,5 г карбамида в течение одной минуты определяли повышение уровня аммиака. Прирост окрашенного столба на 3 мм и выше считали положительным результатом анализа на наличие HP-инфекции.

Теоретическая модель схемы анализа выброса аммиака (или аммиака и полиаминов) может быть представлена математической зависимостью экспоненциального вида (рис. 4).

Усовершенствование тест-систем позволило предложить к эксплуатации две модификации уреазного дыхательного теста. Суть первой модификации заключается в одномоментном использовании двух индикаторных трубок разных типов ИТМ–12эо и ИТ-NH_3. Средняя концентрация, измеряемая индикаторными трубками, может быть представлена как площадь под этой зависимостью за определенный промежуток времени. Справа – по традиционной методике. Слева (черный квадрат) – по предлагаемой ускоренной методике, которая вместо максимальной концентрации группы веществ, дающих индикационный эффект, фиксирует начальную скорость выделения, главным образом, аммиака. Поскольку индикаторная трубка ИТМ–12эо фиксирует концентрацию аммиака и замещенных аминов суммарно, а индикаторная трубка типа ИТ-NH_3 только концентрацию аммиака, то при выполнении методики UBT-NH_3 одновременно ИТ двух типов, разница между показателями указывает на характер воспалительного процесса. Более высокие показатели ИТМ–12эо указывают на развитие эрозивных процессов слизистой оболочки желудка (рис. 5). Отсутствие аммиака по ИТ–NH_3 при наличии значимого индикационного эффекта в случае с ИТМ–12эо указывают на наличие воспалительных процессов или язвенной болезни не связанной с HP.

При рутинных анализах определение C_1 и C_2 может быть выполнено одной индикаторной трубкой с двух сторон, так как флокированная нить, использующаяся в качестве ограничителей в полимерном корпусе, обеспечивает надежное закрепление за счет упругости ворса. При необходимости (автоматическое определение размера индикационного эффекта) нить может иметь цвет сработавшей индикаторной рецептуры и с учетом

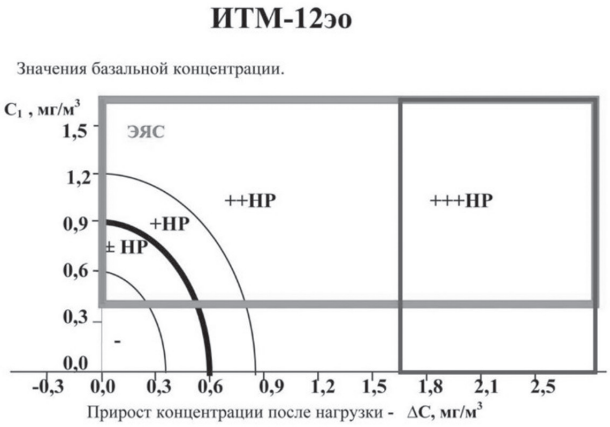

Рис.5.
Оценка результатов анализа индикаторной трубкой типа ИТМ-12: HP – инфицированность хеликобактером (зона внутри группы дуг соответствует отсутствию HP); наличие эрозивно-язвенных состояний в активной фазе (ЭЯС – верхний квадрат); наличие других сопутствующих паталогий, например инвазия Лямблий (правый квадрат).

фактуры материала не отличаться по характеристикам отражения, то есть может выполнять и роль эталона индикационного эффекта.

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, и по сей день работающих над созданием и совершенствованием отечественной медицинской диагностики по составу газовой среды. В основе этой газоаналитической диагностической методики лежат патенты РФ 2091796 и 2100010 и НОУ-ХАУ по изготовлению тест систем.

Ее исполнение в одном из рабочих вариантов выглядит следующим образом:

1. Вставить индикаторную трубку ИТ-NH_3. одним концом в шланг аспиратора (микрокомпрессор ELITE-801 или 802 модифицированный).

2. Поместить свободный конец трубки в ротовую полость обследуемого, так чтобы она находилась под углом 45^0 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-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 (см. п. 3 Примечания).

8. Спустя 3,0±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 45^0 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).

10. Вычесть из C_2 C_1. Полученное число означает нагрузочную концентрацию аммиака в ротовой полости в (ΔC). 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.

11. Отметить на номограмме (рис.6) точку по вертикальной оси и точку по горизонтальной оси.

12. Отметить точку пересечения линий параллельных осям из этих точек.

13. Оценить полученный результат по номограмме: Если точка пересечения лежит вне сектора эллипсов с центром в начале координат, то инфицирование НР несомненно. Если точка пересечения лежит в секторе первого эллипса, то есть вблизи от начала координат, то отсутствие инфицирования НР несомненно.

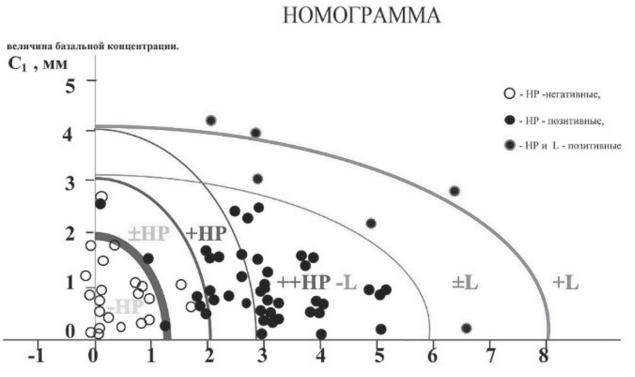

Рис. 6.
Номограмма оценки результатов по методике ХЕЛИК-тест.

Примечание:

1. 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.

2. 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 «АЭРОТЕСТ»). Пациента нужно обследовать и на лямблии (L), если показатели теста находятся в «красной» зоне.

3. При оценки уреазной активности ротовой полости (вариант контроля эрадикации НР в ротовой полости) ротовую полость ополаскивают указанным в п. 7 раствором карбамида и выплевывают его не проглатывая.

Чувствительность и селективность для данного методического подхода при использовании индикаторных трубок ООО «Синтана СМ» составляет 95-96%.

Методика в модифицированном варианте может использовать в качестве прокачивающего устройства медицинский шприц на 5 или 20 мл в зависимости от конструкции индикаторной трубки и может быть рассчитана на использование непосредственно пациентом для диагностики и контроля терапии в бытовых условиях.

ЛИТЕРАТУРА
1. Marshall, B.J., Warren, J.R., Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis // Lancet 1983, June 4; p. 1273-1275.
2. Корниенко Е.А., Милейко В.Е. Гелик-тест – неинвазивный метод диагностики геликобактериоза. – «Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии», 1998, N6, с.34-38.
3. Течение и исходы хронических заболеваний гастродуоденальной зоны у детей и подростков : афтореферат дис. Мельниковой Ирины Юрьевны доктора медицинских наук : 14.00.09 / С. Петерб. мед. акад. последиплом. образования – Санкт-Петрбург, 2005 – Количество страниц: 43с.