

# ХЕЛИКОБАКТЕРИОЗ И ЕГО ДИАГНОСТИКА УРЕАЗНЫМИ ТЕСТАМИ

Милейко В.Е., Григорян Т.М.

ООО «Синтана СМ», ЛОГБУЗ «Детская клиническая больница»

К сожалению, в желудке многих людей живет микроорганизм, который сегодня называется *Helicobacter pylori*. Ранее он назывался *Campylobacter pylori* [1]. Его этиопатогенная роль в развитии группы заболеваний верхних отделов ЖКТ достоверно доказана, а первооткрыватели этой роли, связавшие присутствие этой извитой спиралевидной бактерии с возникновением антрального гастрита и язвенной болезни двенадцатиперстной кишки, стали лауреатами Нобелевской премии. Инфицирование *Helicobacter pylori*, как и энтеробиоз считается самым распространенным заболеванием. В нашей стране *Helicobacter pylori* можно обнаружить у 7-8 человек из десяти. Этот микроб в отличие от многих других бактерий способен жить в желудке человека, где присутствует агрессивная солянокислая среда и пищеварительные ферменты. Многие бактерии попав в такую среду не проживут и десяти секунд. Поэтому *Helicobacter pylori* для того, что бы успешно выживать в такой среде и убежать от воздействия желудочной кислоты вырабатывает определенные вещества, которые помогают ему создать удобную для него среду обитания. Одно из этих веществ – фермент уреазы. Уреазы гидролизует эндогенный карбамид (мочевину), который оправданно присутствует во всех биологических жидкостях организма. Карбамид синтезируется печенью и необходим для нормальной жизнедеятельности человека. В ходе ферментативного гидролиза карбамида образуются углекислый газ и аммиак. Последний вступает в реакцию нейтрализации с желудочной соляной кислотой. Углекислый газ же в свою очередь не задерживается в кислой среде и транспортируется из зоны гидролиза (то есть проживания *Helicobacter pylori*). Вокруг бактерии образуется защитная зона – некое защитное «облако». Благодаря этому *Helicobacter pylori* не погибает в солянокислой среде желудка, а проникает в слизистую оболочку, где начинает размножаться параллельно выделяя уреазу, другие ферменты и цитотоксины, весьма вредные для человеческого организма.

Инвазия бактерии *Helicobacter pylori* в организм человека приводит к возникновению таких весьма распространенных заболеваний, как гастрит, гастродуоденит, язвенная болезнь желудка и двенадцатиперстной кишки. В отдельных случаях длительное присутствие бактерии в организме и связанное с этим длительное течение заболеваний приводит к онкологическим заболеваниям, и в частности, к раку желудка.

В тоже время инфицирование *Helicobacter pylori* часто и не сопровождается какими-либо клиническими проявлениями. Но это бессимптомное носительство существует до поры до времени. Стоит иммунитету сделать паузу и возникнет клиническая картина характерная для гастрита и/или язвенной болезни: боли в животе, возникающие «на голодный желудок» и проходящие после еды (так называемые «голодные боли»), или, напротив, тяжесть в животе, отрыжка или тошнота и изжога, как раз, возникают после употребления пищи (так называемая верхняя диспепсия). При

этом человек вынужден питаться особым образом: питаться часто, пищу принимать малыми порциями и придерживаться диеты.

Но даже, если эти проявления отсутствуют, бессимптомное присутствие болезнетворного организма не следует рассматривать, как безвредное. Инфицирование *Helicobacter pylori* во всех случаях ослабляет организм, приводит к хронической усталости, нарушает пищеварение и искажает иммунитет. Ферменты *Helicobacter pylori* приводят к постепенным негативным изменениям в организме человека. Например *Helicobacter pylori* способствует накоплению в организме тяжелых металлов ( в частности никеля), которые в детском и подростковом возрасте ведут к неправильному развитию костных и соединительных тканей и, следовательно, с изменению осанки. Как бессимптомное «носительство», так и инвазия с явно выраженной картиной, могут привести не только к развитию аллергизации организма, но к появлению пародонтоза, со всеми вытекающими из этого последствиями.

Гастрит и язвенная болезнь, ассоциированные с *Helicobacter pylori* встречаются уже у детей в возрасте старше 5 лет. Однако, максимальный уровень инфицирования достигается только в юношеском возрасте, и, судя по официальным данным, в нашем регионе сохраняется на достигнутом уровне 60-80% процентов от общего числа населения весь последующий период жизни этого поколения. Таким образом, большая часть населения вполне удовлетворена своим состоянием здоровья и не обращает на наличие этой инфекции никакого внимания, то есть инфицирует здоровых членов популяции бактерией *Helicobacter pylori* через посуду и поцелуи и ждет к 35-40 годам, а то и раньше, клинических проявлений язвенной болезни. Язвенная болезнь обычно сопровождается болями и кровотечениями. Кровотечения обычно сопровождаются рвотой сгустками крови, так называемой «кофейной гущей», и/или черным калом, так называемой «меленой», из-за присутствия крови, свернувшейся в солянокислой среде желудка. Развитие язвы может привести к зональному разрушению всех слоёв желудка и возникновению ситуации, когда содержимое желудка попадет в брюшную полость. Из-за этого возникнет перитонит, который сопровождается очень сильными болями. Это требует незамедлительного хирургического вмешательства. К счастью такое происходит не часто, но случается.

В большинстве случаев проблемы с инфекцией *Helicobacter pylori* ограничиваются лечением гастрита, язвенной болезни желудка или язвы луковицы двенадцатиперстной кишки, а самой распространенной симптоматикой является верхняя диспепсия. Тем не менее, это не снимает проблем лечения и санитарной гигиены, которые неразрывно связаны между собой. Всем ясно, что невозможно окончательно излечиться от *Helicobacter pylori* и остаться здоровым надолго из-за постоянного инфицирования этой бактерией от своих знакомых, родных и близких, которые вы-

ступают в качестве объектов постоянного «бессимптомно-го» носительства *Helicobacter pylori*, и знать ничего не желают об этой бактерии и о её лечении.

Заражение *Helicobacter pylori* происходит орально-орально при длительном контакте и в первую очередь бытовым путем в семье или воздушно-капельным при нахождении в замкнутом помещении. Кроме того, не следует исключать заражение через загрязненные стоматологические или эндоскопические инструменты.

В силу вышеизложенного, многим людям следовало бы поинтересоваться, есть ли у них данная бактерия в наличии. Это особенно необходимо сделать тем, кто имеет описанные выше симптомы, а так же тем, кто с ними проживает. Не стоит обсуждать необходимость диагностического обследования лиц группы риска: в первую очередь врачей, и особенно врачей эндоскопистов и гастроэнтерологов; учителей, работников детских учреждений; военнослужащих, и в первую очередь плавсостава ВМФ. Было бы разумным определить наличие инвазии *Helicobacter pylori* и тем, у кого кто-либо из родственников болел раком желудка, гастритом или язвенной болезнью.

При этом на сегодняшний день существует великое множество достаточно надежных анализов не связанных с эзофагогастроуденоскопическим исследованием, например: выявление антител к *Helicobacter pylori* в крови методом РСК или ИФА; обнаружение фрагмента генома *Helicobacter pylori* методом ПЦР; уреазный тест по крови из пальца, методы «дыхательной диагностики». Однако, стандартным методом (Стандарты диагностики и лечения болезни органов пищеварения, МЗ РФ, 1998.) всё же остается уреазный тест с биоптатом слизистой желудка, полученным в результате эндоскопии.

Классический уреазный тест [2] построен на оценке скорости реакции ферментативного гидролиза карбамида в растворе. При этом тест обычно проводится в стандартных условиях в термостатированном режиме и занимает много времени. Но он достаточно надежен и достоверен. Надежность диагностического подхода по оценке уреазной активности не могло не привлечь внимания исследователей. В первую очередь следовало сократить время анализа и улучшить хранимость. С этой целью для практических лабораторных диагностических исследований связанных с оценкой уреазной активности биоптатов были созданы тест-системы хемосорбционного типа, которые являются довольно сложными топомимическими реагентами на основе волокнистых и кристаллических материалов. Справедливости ради, следует отметить, что промежуточным вариантом тест-системы были жидкие высокоточные растворы карбамида в фосфатном буфере малой емкости и большой ионной силы (за счет солевых добавок) с Феноловым красным в качестве индикатора кислотного-основного перехода и Юглоном в качестве консерванта, расфасованные в микро ампулы. Применение таких растворов в микро ампулах было весьма эффективно в диагностических исследованиях, так как не только позволило стандартизировать методику, но и 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 на сегодняшний день методик и тест систем для выполнения аналитической процедуры серийно «сухой» уреазный тест можно считать наиболее простым и эффективным в эксплуатации, не дорогим и, соответственно, наиболее популяр-

ным. Этот тест, выполняемый по патенту РФ № 2184781 и называемый ХЕЛПИЛ-тест [3] получил в нашей стране широкое распространение. Методика ХЕЛПИЛ-тест выполняется с помощью тест-системы *HelPil-test* (производитель ООО «Синтана СМ»), Санкт-Петербург), *HelPil-tests* (производитель SIA «MED PRO», Латвия), или тест-системы ХЕЛПИЛ (производитель ООО «Ассоциация Медицины и Аналитики», Санкт-Петербург). Этот тест, несмотря на кажущуюся конструктивную простоту, одновременно является, как гелевым тестом, так и газоаналитической тест-системой одновременно (рис.1), что видно из характера развития индикационного эффекта.

В основе превосходства методики ХЕЛПИЛ-тест над другими уреазными тест методами лежит подход, принципиально отличающий его от других уреазных тест систем. Во-первых, тест использует в качестве реакционной среды не стандартизованный раствор буфера, а как раз дифференцированную по 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 слизистой отличаются по содержанию межклеточной жидкости, тем больше её впитывается в адсорбент и, следовательно, больше в количественном отношении поступает фермента для взаимодействия с субстратом. Третьим отличительным качеством ХЕЛПИЛ-теста является то, что индикатор в кислой форме является гидрофильным материалом и начинает растворяться только выше определенного pH. То есть растворение Бромтимолового синего 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 волокон. При этом сам «отработанный» индикатор выводится из сферы реакции.

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 *Helicobacter pylori*. «Сухой» уреазный тест ХЕЛПИЛ позволил сократить время аналитической реакции более чем в 10 раз по сравнению с самыми быстрыми вариантами «жидких» тестов. Контрольными точками в методике ХЕЛПИЛ-тест стали 30 секунд, 1 минута и три минуты. Но уже через 5 минут тест становился не пригодным для оценки. Поэтому некоторые пользователи «с непривычки» умудряются пропускать контрольное время.

Необходимость диагностики инфекции *HP* как таковой, в том числе и бессимптомной патологии, а не только связанной с наличием эрозивно-язвенных состояний в активной фазе, заставило нас применить «нагрузочный дыхательный» тест, предполагающий прием пациентом раствора карбамида нормального изотопного состава [4]. Оценка изменения содержания аммиака в воздухе ротовой полости после нагрузки карбамидом нормального изотопного состава (рис. 2) и оценка характера этого изменения

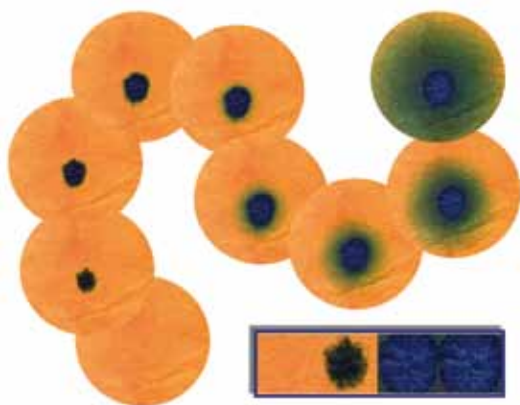


Рис. 1. Развитие индикационного эффекта на поверхности тест-системы после контакта тест-системы ХЕЛПИЛ и биоптата, прицельно изъятого у сильно инфицированного хеликобактером пациента в ходе эндоскопического исследования: на рисунке представлены цифровые фотографии, выполненные с интервалом 3-4 секунды; для демонстрации быстрого действия методики ХЕЛПИЛ-тест использована тест-система HelPil-test, изготовленная ООО «Синтана СМ».

с учетом базальной концентрации (рис 3), является вполне надежной высокочувствительной и селективной методикой (методика UBT- NH<sub>3</sub>) [5]. Широко применяются и упрощенная методика (методика ХЕЛИК-тест, ГЕЛИК-тест [6]), построенные на измерении прироста содержания аммиака в ротовой полости в начальный момент его выделения (рис 4). 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 индикаторной трубки время аналитической процедуры существенно отличается. Для индикаторных трубок ИТННЗ и ИТ- NH<sub>3</sub> (производитель ООО «Синтана СМ», Санкт-Петербург) время пробоотбора стандартным компрессором составляет 20 секунд и 30 се-

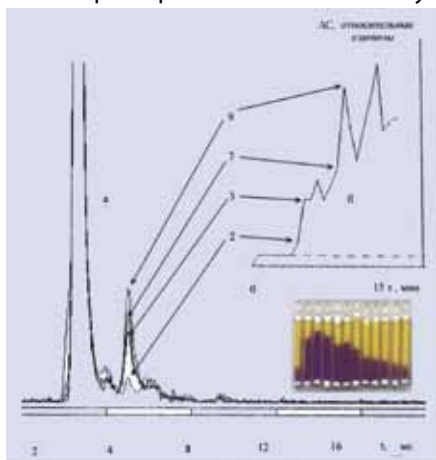


Рис. 2. Характер изменения содержания аммиака в воздухе ротовой полости. Измерения выполнены параллельно индикаторными трубками ИТМ-12 и спектрометром ионного дрейфа (производитель ООО «ЛБМ», Санкт-Петербург).

кунд, соответственно, а для трубки ИТМ-12эо (производитель ООО «Синтана СМ», Санкт-Петербург), как и для индикаторной трубки – «Тест-система ХЕЛИК® с индикаторной трубкой» (производитель ООО «Ассоциация Медицины и Аналитики», Санкт-Петербург) оно составляет 5- 6 минут. Кроме того, аналитическая процедура с индикаторными трубками может проводиться с использованием одноразового медицинского шприца на 20 мл в качестве прокачивающего устройства, так как объем газовой пробы, необходимой для анализа, составляет 20-25 см<sup>3</sup>. Это делает методику более удобной и пригодной для индивидуального пользо-

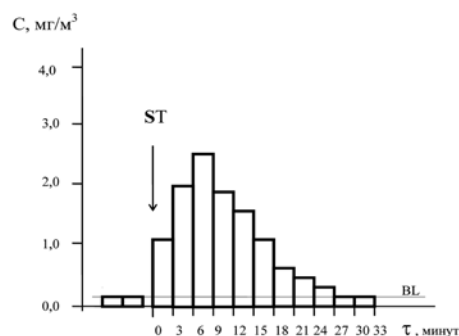


Рис. 3. Характер изменения содержания аммиака в воздухе ротовой полости у НР-позитивного больного после приема 500 мг мочевины: прямоугольник характеризует усредненную концентрация аммиака за 3 минуты; BL - базальный уровень, S - момент приема мочевины.

вания. Группа методик ХЕЛИК-тест, проводимая несколькими типами индикаторных трубок одновременно, позволяет не только установить факт инфицирования НР, но и оценить активность воспалительного процесса, а также вероятность сопутствующей инвазии Лямблиями (рис.5). 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/м<sup>3</sup>. Для этой цели весьма пригоден, например ион-дрейфовый спектрометр высокого разрешения [5]. Однако, следует напомнить, что применение одноразовых тест-систем в медицине не только снижает ряд вопросов связанных с санацией и дезинфекцией оборудования, но и повышает надежность и достоверность полученных данных, упрощая аналитическую процедуру до требований, приемлемых пользователем. Именно поэ-

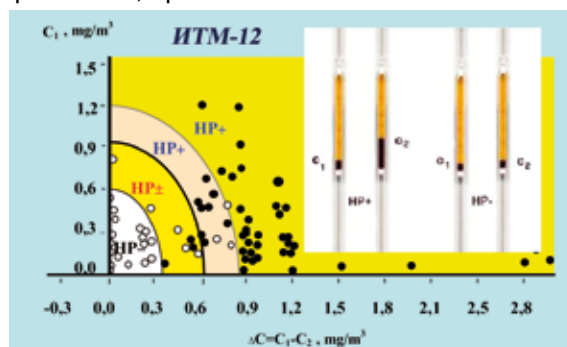


Рис. 4. Номограмма для оценки результатов анализа полученных с помощью ИТМ-12 по методике ХЕЛИК-тест.

тому в медицинской практике применение одноразовых приборов, каковыми являются линейные газоанализаторы – индикаторные трубки, и других одноразовых химических и физико-химических сенсоров достаточно актуально.

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 [7,8].

Поскольку ложноположительные результаты выявления *HP* влекут за собой неоправданное назначение дорогостоящего лечения, оказывающего и сопутствующее неблагоприятное влияние на различные функции организма, ак-

личные формы для принимаемого пер орально карбамида (жевательная резинка [10, 11], растворы или быстро растворимые гранулы и тому подобное). Но главным было использование «дыхательной» методики для прогнозирования терапии и контроля за эффективностью лечения непосредственно в ходе его проведения с целью адекватной корректировки схемы терапии. Такая возможность логически вытекает из неинвазивности и атравматичности. Эта диагностическая процедура может быть без ущерба для пациента проведена многократно, как в период предшествующий лечению, так и в ходе самой терапии и/или по её завершению. Именно проведение неинвазивной «дыхательной» диагностики *in vivo*, позволяет реально оценить конкретное воздействие препаратов, назначенных для лечения, уже через пять, шесть дней с начала приема медикаментов и при необходимости усилить или изменить схему не дожидаясь окончания приёма неэффективных медикаментов. Это направление, примыкающее к традиционной диагностике, является весьма перспективным для улучшения качества терапии хеликобактериоза.

#### ЛИТЕРАТУРА

Аруин Л.И., Григорьев П.Я., Исаков В.А., Яковенко Э.П. Хронический гастрит, Амстердам, 1993, 362с.

Сафонова Н.В., Жебрун А.Б. Гастрит, язвенная болезнь и хеликобактериоз. Рекомендации для врачей. - СПб, 1993. 40 с.

Корниенко Е.А., Гольбиц С.В., Милейко В.Е. и др. О диагностике инфекции *Helicobacter pylori* у детей. //Российский вестник перинатологии и педиатрии, 1998, №5, с 34.

Дмитриенко М.А., Корниенко Е.А., Милейко В.Е. Патент РФ № 2184781, С 12 Q 1/04, 1/00, «Способ диагностики хеликобактериоза по оценке уреазной активности биологического материала и устройство для его осуществления», опубл. 10.07.2002 Бюл. № 19, приоритет от 30.09.1997.

Корниенко Е.А., Милейко В.Е., Самокиш В.А. и др. Неинвазивные методы диагностики инфекции, вызванной *Helicobacter pylori*. // Педиатрия, 1999, №1, с.37-41.

Корниенко Е.А., Милейко В.Е. Гелик-тест – неинвазивный метод диагностики хеликобактериоза. – «Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии и колопроктологии», 1998, №6, с.34-38.

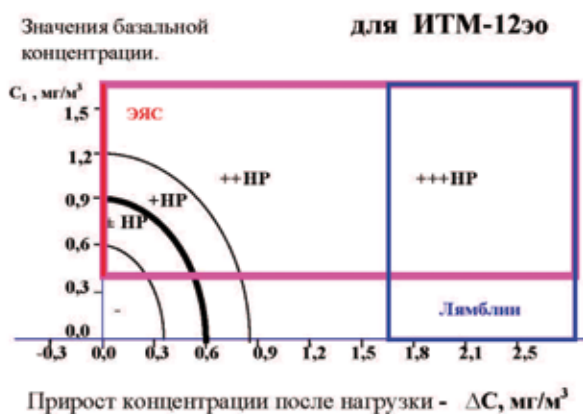
Денисова Е.В., Курбатова Э.А., Милейко В.Е. оценка диагностических результатов методами визуализации с последующей автоматизированной компьютерной верификацией. - с 95-97. // в сб. Школа-семинар «Актуальные проблемы современной хирургии» СПб, НИИХимии СПбГУ, 2000.- 152 с.

Mileiko V, Melnikova I, Ivanova S et al. Gas Analysis in Medical Diagnostics. P109. //Book of Abstracts – Seventh International Symposium on Hyphenated Techniques in Chromatography and Hyphehated Chromatographic Analyzers (HTC-7), Brugge, February 6-8, 2002- Royal Flemish Chemical Society (KVCV), 2002, 410 p.- ISBN 90-74870-05-8

*Helicobacter pylori*: революция в гастроэнтерологии. Под редакцией акад. РАМН В.Т. Ивашкина, проф. Ф. Мерго, Т.Л. Лапиной.- М., «Триада-Х», 1999, 255 с.

Иванов А.В., Милейко В.Е. РФ Пат. № 2176792 от 15.05.1998 «Способ исследования уреазной активности».

Корниенко Е.А., Милейко В.Е., Григорян Т.М. 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.



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

туальность повышения надежности диагностических результатов несомненна. Кроме того, значительную проблему составляет и резистентность отдельных штаммов *HP* к составным элементам комплексной антихеликобактерной терапии. Именно с этой проблемой связывают низкую эффективность медикаментозного воздействия некоторых схем эрадикации *HP* на эти бактерии у части пациентов [9]. Определение чувствительности *HP* к 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 *HP* к медикаментам выполняется в культуре *in vitro*, что дает весьма отдаленные представления о эффективности терапии этими медикаментами *in vivo*.

Поэтому дальнейшее совершенствование методик и, в первую очередь неинвазивного диагностического подхода, было направлено на снижение уровня гипергаммониемии, связанное с приемом карбамида у пациентов с высоким уровнем инвазии *HP*. Проводилось улучшение контрольной, и нагрузочной схемы, с целью еще большего повышения селективности и чувствительности методик. В рамках этих подходов в методиках использовались раз-