

УДОБНАЯ АТРАВМАТИЧНАЯ МЕТОДИКА ДИАГНОСТИКИ ХЕЛИКОБАКТЕРИОЗА

А.В. Иванов*, В.Е. Милейко**
*ООО «Доктор Иванов», **ООО «Синтана СМ»

Биохимические методики контроля уреазной активности биологических объектов всегда являлись, и всегда будут являться базовыми методиками для контроля и оценки бактериальной насыщенности изучаемой бактериальной среды. Их простота и надежность общеизвестна.

Роль уреазных биохимических методик существенно возросла с открытием этиопатогенной роли *Helicobacter pylori* в развитии группы гастродуоденальных и сопутствующих им патологий. *Helicobacter pylori* является весьма активным уреазопродуцентом. Его уреазы высокоактивна активностью и вырабатывается этой бактерией в огромных количествах. Распространенность инфекции в человеческой популяции достаточно высока, а ее симптоматические проявления весьма разнообразны, как при хроническом течении болезни, так и при первоначальном инфицировании. В связи с этим сегодня наряду со старыми терминами, антральный гастрит, язвенная болезнь, гастродуоденит стал широко употребляться термин хеликобактериоз.

Инфекция *Helicobacter pylori* передаётся главным образом от человека к человеку орально-оральным путем: через пищеварительный тракт (поступление микроба в пищевод через рот или через вдыхаемый воздух). Микроб выбирает местом своего жительства зубо-десневые карманы рта и слизистую оболочку желудка. При этом нельзя исключить и фекально-оральный тип распространения характерный для кишечных инфекций.

Основной источник инфекции – инфицированные члены семьи.

Риск заражения при постоянном контакте с заражённым человеком у детей составляет 5-10% в год, то есть к 16 лет почти все контактирующие дети заражены от старших взрослых членов семьи. Кроме, того следует добавить, что работники детских учреждений и работники детского здравоохранения так же являются потенциальным источником заражения детей.

Взрослые не так сильно восприимчивы к *Helicobacter pylori*. В силу таких обстоятельств часто бывает так, что один из взрослых а семье инфицирован, а другой - нет. Мы полагаем, что лечить от *Helicobacter pylori* детей следует совместно с взрослыми членами семьи. Для взрослых людей и детей при этом должно быть подобрано адекватное индивидуальное лечение.

Для **лечения инфекции *Helicobacter pylori*** обычно применяются от 2-х до 4-х лекарственных препаратов. Международные и Российские рекомендации предлагают:

Как минимум 2 антибиотика, чаще макролиды (кларитромицин, азитромицин) или амоксициллин (флемоксин солютаб и т.д.).

Кроме того, применяются препараты, предотвращающие выделение соляной кислоты:

блокаторы H₂ –гистаминовых рецепторов (циметидин, ранитидин, фамотидин)

блокаторы протонной помпы – более эффективные, чем блокаторы H₂ –гистаминовых рецепторов (омепразол, ланцезепразол и т.д.).

Применяют препараты висмута: Де-Нол®, бисмофальк.

Применяют препараты нитроимидазола: трихопол (метронидазол), тинидазол и т.д.

Стандартная схема для взрослых:

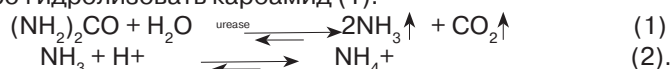
амоксициллин (советуем флемоксин солютаб) 1000 мг. Утром и вечером через час после приёма пищи, одновременно кларитромицин 500 мг 2 раза в день через час после еды (или клацид СР 500 мг. 1 раз в день), одновременно омепразол (гастрозол, ультоп) 20 мг. утром и вечером за 15 минут до еды. Принимать препараты нужно одновременно в течение 10-14 дней: соответственно при приёме в течение 14 дней эффективность составляет около 98%, в течение 10 дней – 85-90%. Существует более десятка альтернативных схем лечения с разной вероятностью эффективности и развития побочных эффектов.

После окончания курса лечения рекомендуем восстановить микрофлору кишечника, например, приёмом капсул Бифиформ или Примадофилус.

Контроль лечения с помощью предлагаемой системы можно проводить не раньше, чем через 21 день после окончания лечения, с помощью антител контролировать лечение нельзя. С помощью уреазных тестов с образцами ткани желудка контроль лечения можно проводить так же не раньше, чем через 21 день после окончания лечения.

Возвращаясь к проблемам диагностики, следует отметить, что основными методами диагностики хеликобактериоза являются: бактериологический, гистологический и биохимический (уреазный тест). Они сопряжены с эндоскопическим исследованием и взятием биоптата - являются инвазивными (то есть связаны с проникновением внутрь организма) и неприемлемы для частого повторного использования у больного.

Биохимический уреазный тест построен на чрезвычайно высокой активности уреазы *Helicobacter pylori*, способной быстро гидролизовать карбамид (1):



Helicobacter pylori обнаруживается в биоптате, изъятном из слизистой желудка, по изменению окраски кислотно-основного индикатора в ходе изменения pH среды. Этот биохимический тест *in vitro* органически связан с эндоскопией, достаточно дорогой, сложной и болезненной процедурой, способной привести к реинфицированию и, следовательно, может использоваться для первичной диагностики, но не оправдан для контроля терапии. Для динамического наблюдения за пациентом и контроля за эффективностью терапии необходимы более простые и удобные, неинвазивные методы. Этим требованиям отвечают серологические и «дыхательные» тесты.

Серологический метод состоит в обнаружении специфических антител к *Helicobacter pylori*. Одним из них является тест ELISA, легко осуществимый в лаборатории. Но все эти методики травматичны, так как связаны с отбором крови у пациентов, к тому же уровни антител в сыворотке не могут в полной мере служить критерием контроля терапии, так как серологический тест подменяет контроль состояния микроба контролем состояния пациента.

Исключением являются только ПЦР методики, которые предполагают в качестве биологического образца слюну или кал. Они и используются для скрининговых исследований, но уступают вышеописанным методикам в реальном широком применении по селективности и чувствительности.

«Дыхательные» тесты, в основе которых лежит определение в выдыхаемом воздухе продуктов гидролиза мочевины *in vivo*, лишены этих недостатков. UBT методики («urea breath test») предполагают для таких исследований использование изотопных маркеров и реакция ферментативного гидролиза происходит не с $^{12}\text{C}^1\text{H}_4^{14}\text{N}_2^{16}\text{O}$ (карбамидом нормального изотопного состава), а с аналогами: $^{13}\text{C}^1\text{H}_4^{14}\text{N}_2^{16}\text{O}$, или $^{14}\text{C}^1\text{H}_4^{14}\text{N}_2^{16}\text{O}$, или $^{12}\text{C}^1\text{H}_4^{15}\text{N}_2^{16}\text{O}$. То есть эти методические подходы предполагают прием *per os* мочевины, меченной радиоактивным ^{14}C или стабильным ^{13}C , и контроль процесса ее гидролиза *in vivo* по содержанию изотопов углерода ^{14}C и ^{13}C в выдыхаемом CO_2 . В этих методиках реализован кинетический подход: временное повышение содержания исследуемого вещества и оценка скорости этого процесса. Аналитический отклик на внесение в реакционную среду одного из реагентов легко регулируется. Однако, по мнению авторов «нагрузочных» методик, проконтролировать процесс ферментативного гидролиза *in vivo* по продуктам нормального изотопного состава невозможно из-за того, что мочевина присутствует во всех биологических жидкостях человека, а углекислый газ содержится в выдыхаемом воздухе. Кроме того, мнение, что аммиак нацело реагирует с соляной кислотой (2) достаточно популярно даже в свете современного подхода к изучению химических равновесий. Поэтому Северной Америке и Европе распространены методы определения изотопов углерода ^{14}C и ^{13}C в выдыхаемом воздухе после приема пациентом меченной ими мочевины. Чувствительность этих методов достигает 96%, специфичность - также 98%. Использование ^{14}C в детской практике ограничено ввиду его радиоактивности. Определение ^{13}C в выдыхаемом воздухе возможно лишь с помощью масс-спектрометра или методов диодно-лазерной спектроскопии

Наиболее популярная в России отечественная оригинальная разработка основана на определении другого газообразного продукта гидролиза мочевины – аммиака. Аммиак образуется под действием уреазы *Helicobacter pylori* из мочевины (карбамида) нормального изотопного состава принятой внутрь.

Классическая методика углеродного теста $^{14}\text{C}^*$ состоит в следующем: утром натощак обследуемый получает пробный завтрак и сразу после него 20 мл воды, содержащей 10 мк Кюри мочевины, меченной $^{14}\text{C}^*$. Спустя 10, 20, 30, 40, 60, 80, 100 и 120 минут производят отбор проб воздуха, выдыхаемого пациентом через трубочку в сосуд, в котором находится 2 ммоль хиамин (вещества, связывающего CO_2) в 2 мл спиртового раствора фенолфталеина. Обесцвечивание этого раствора свидетельствует о том, что он связал 2 ммоль CO_2 . Затем к нему добавляют 10 мл сцинтиллята, содержащего толуен. Активность $^{14}\text{C}^*$ измеряется жидкостным сцинтиллятором, в каждой пробе вычисляется % содержания изотопа на ммоль CO_2 . Максимум нарастания при положительном результате исследования обычно фиксируют на 40-60 мин. исследования. В последние годы появились модифицированные упрощенные варианты этой методики, когда производится забор не всех проб, а лишь на 40-60 мин. (Raws E., Royen E., Langenberg W. et al., 1989). Hamlet A.K. с соавт. (1995) и Peura D.A. с соавт. (1996) независимо друг от друга разработали варианты быстрого 10-минутного углеродного $^{14}\text{C}^*$ дыхательного теста с приемом микродоз меченой мочевины в капсуле без предварительного завтрака. Методы показали столь же высокую чувствительность и специфичность, как и классический вариант – чувствительность составила 97-99%, а специфичность – 95%-98%.

Методика проведения углеродного теста с ^{13}C сходна с вышеописанной, но если регистрацию $^{14}\text{C}^*$ проводят с помощью сцинтиллятора, то для определения ^{13}C , который не обладает радиоактивностью, требуется высокочувствительный газовый масс-спектрометр, который с высокой точностью может уловить микродозы ^{13}C в выдыхаемом воздухе (0,03%). Однако перед исследованием необходимо исключить из диеты злаки и тростниковый сахар, так как они содержат ^{13}C (Schoeller D.A., Klein P.D., Watkins J. et al., 1980). Пробный завтрак при проведении исследования должен иметь специальный состав (специальный пудинг или мороженое), чтобы максимально замедлить эвакуацию из желудка (Klein P.D., Graham D.Y., 1989). Затем обследуемый принимает раствор, содержащий 250 мг ^{13}C . Пробы выдыхаемого воздуха производятся через 20, 30, 40, 50 мин., плотно закрываются и транспортируются, содержание изотопа определяется с помощью масс-спектрометра (Schoeller D.A., Klein P.D., 1979), затем рассчитывается % содержания изотопа в выдыхаемом воздухе с учетом площади поверхности тела (Haycock G., Chir B., Schwartz G., Wisotsky D., 1978). Чувствительность и специфичность углеродного теста с ^{13}C приближаются к таковым у теста с $\text{C}14$ и примерно равны 97-98% (Graham D.Y., Klein P.D., Evans D.G. et al., 1991).

При сравнении этих двух дыхательных тестов видны преимущества и недостатки каждого. Метод с определением $^{14}\text{C}^*$ не может использоваться у детей и женщин ввиду его радиоактивности, метод с ^{13}C абсолютно безопасен, но требует использования чрезвычайно дорогого масс-спектрометра, стоимость которого доходит до 25 000 долларов США (Аруин Л.И., Григорьев П.Я. с соавт., 1993). Стоимость исследования одного больного составляет 300 долларов (Sardi B., 1997). С целью удешевления данного метода для регистрации ^{13}C в нашей стране стала применяться диодная лазерная спектроскопия (Ивашкин В.Т. с соавт., 1998).

В основе отечественного метода «дыхательной» диагностики лежит оценка прироста концентрации аммиака в воздухе ротовой полости после приема пациентом мочевины **нормального** изотопного состава $^{12}\text{C}^1\text{H}_4^{14}\text{N}_2^{16}\text{O}$. Поступившая в желудок через рот и пищевод порция мочевины (так называемая «нагрузка») при наличии в желудке НР гидролизует его уреазой, вызывая усиленное образование углекислого газа и аммиака и как следствие нарастание концентрации NH_3 в воздухе ротовой полости (выдыхаемом воздухе). Наиболее просто это фиксируется с помощью индикаторных трубок определяющих аммиак по изменению цвета адсорбента, содержащего хромогенный индикатор. Диагностически значимыми для обнаружения инвазии *Helicobacter pylori* являются концентрации аммиака в интервале от 0,01 до 3,0 мг/м³ или концентрации CO_2 0,05-1,0 % об. Однако, диагностический метод определяющий повышение углекислого газа, связанное с присутствием инвазии *Helicobacter pylori*, развития не получил. А вот методический подход, связывающий повышенное содержанием аммиака в ротовой полости за счёт гидролиза эндогенной мочевины (карбамида) с гастродуоденальными патологиями, вызванными *Helicobacter pylori* возник уже в 1992 году и весьма эффективно использовался для диагностики заболеваний в первую очередь в педиатрической практике. В 1996 году он был дополнен нагрузкой карбамидом нормального изотопного состава и превратился в методику **ХЕЛИК-тест**[®] (ГЕЛИК-тест, УВТ- NH_3 - тест).

Один из вариантов методики:

Сначала у каждого пациента натошак в воздухе ротовой полости измеряют «фоновую» концентрация аммиака. Затем обследуемый принимает карбамид и концентрацию аммиака оценивают повторно. Прирост концентрации аммиака свидетельствует о степени инфицирования пациента бактерией *Helicobacter pylori*. Общее время проведения анализа составляет 18-20 минут и обусловлено физиологическими особенностями человека.

Этим методом на сегодня в России обследованы сотни тысяч человек. В ходе разработки этой медицинской методики диагностики результаты анализов сопоставлялись с результатами анализов по другим методикам (гистологическим и биохимическим) более чем для 5000 пациентов. Разработанные нами «дыхательные» тесты показывают высокие характеристики по чувствительности (95%) и специфичности (96%).

Разработанные в России методики и тесты позволяют эффективно проводить диагностические исследования и осуществлять контроль терапии в соответствии с принятыми в медицинской практике подходами. Тест-системы (индикаторные трубки ХЕЛИК-тест, производитель ООО «АМА», и индикаторные трубки ИТМ-12эо, ИТ- NH_3 , производитель ООО «Синтана СМ», ИТ NH_3 , производитель SIA “MEDPRO”) позволяют достоверно оценивать содержание аммиака в воздухе в интервале концентраций от 0,3 до 5,0 мг/м³ и обнаруживать по уреазной активности крайне незначительные инвазии *Helicobacter pylori*.

Разработанный в России, диагностический физико-химический метод анализа воздуха ротовой полости с использованием одноразовых индикаторных, как и его аналог в приборном оформлении, широко используется в практическом здравоохранении.

На сегодня этот кинетический метод, разработанный 15-19 лет назад для диагностики инфекционных заболеваний по аммиаку в выдыхаемом воздухе (воздухе ротовой полости), достаточно отработан и усовершенствован до весьма удобной и простой методики определения инфекции *Helicobacter pylori* (sintana.ru). Диагностика проводится без прямого контакта с бактерией, что тоже не маловажно для реальной медицинской практики. Все разработанные аналитические тест-системы являются воспроизводимыми и имеют высокие метрологические характеристики (рис. 1).

Этот метод анализа с использованием одноразовых индикаторных трубок постоянно совершенствуется, как в плане улучшения методики применения индикаторных трубок, так и в плане конструкции самих линейно-кolorистических одноразовых газоанализаторов – индикаторных трубок.

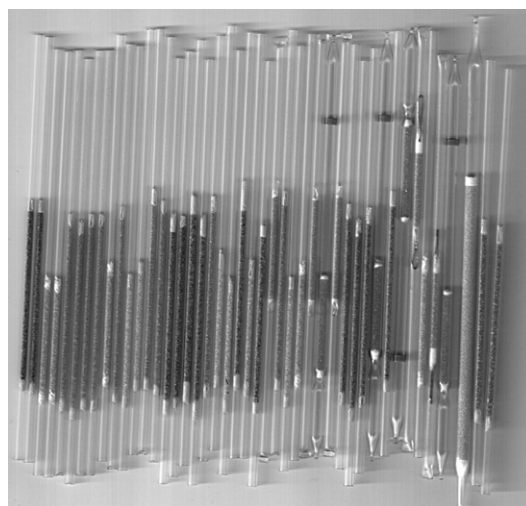


Рис.1. Различные индикаторные трубки применявшиеся и применяющиеся для диагностики *Helicobacter pylori* по воздуху ротовой полости.

Рис.2. Диагностический набор ГАСТРО-тест.



Поэтому сегодня на рынке появился набор **ГАСТРО-тест**. Этот диагностический набор (*хелик.ком*) предназначен для выполнения «дыхательной» диагностики *Helicobacter pylori*, как в условиях медицинского учреждения, так и в домашних условиях непосредственно пациентом (обследуемым). Набор (рис. 2) производится одним из изготовителей высокочувствительных тест-систем для данного вида диагностики ООО «Синтана СМ» по заказу ООО «Доктор Иванов» и не имеет отечественных и зарубежных аналогов.

Методика является комплексной и включает в себя обобщенный многолетний опыт различных методических подходов, эффективно использовавшихся в разные годы для диагностики гастродуоденальной патологии ассоциированной с *Helicobacter pylori*:

Методика по выполнению неинвазивной методики ГАСТРО-тест: комплексная методика УВТ-ННЗ диагностики, включающая методики «АЭРОТЕСТ» и ХЕЛИК-тест.

НАЗНАЧЕНИЕ И ПРИНЦИП ДЕЙСТВИЯ

Методика предназначена для быстрой неинвазивной и атравматичной диагностики присутствия инфекции *Helicobacter pylori* (HP). Тестирование основано на оценке содержания аммиака в воздухе ротовой полости. Оценка осуществляется по изменению цвета индикаторной трубки с желто-оранжевого на синие-фиолетовый. Этапы тестирования: анализ содержания аммиака в воздухе ротовой полости и оценка состояния обследуемого (метод «АЭРОТЕСТ»); анализ содержания аммиака в воздухе ротовой полости после приема карбамида и оценка состояния обследуемого по отличию первого и второго показателя теста (метод ХЕЛИК-тест).

ПРИМЕЧАНИЕ: Тестирование проводится натощак. Прием алкоголя, антибиотиков, противовоспалительных, обезболивающих, антацидных и антисекреторных препаратов накануне тестирования исключается.

ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

В комплекте: индикаторная трубка; соединительный шланг, шприц; карбамид на одно обследование в ёмкости на 50 мл; одноразовый стаканчик, инструкция.

Дополнительно потребуется: средство измерения времени (часы), линейка, питьевая вода.

ПОДГОТОВКА К ТЕСТИРОВАНИЮ

1. Достать из тубуса шприц с присоединенной к нему индикаторной трубкой, стаканчик, ёмкость с карбамидом в гранулах. Подготовить питьевую воду в количестве 40-60 мл.

2. Открыть ёмкость с карбамидом и заполнить её на одну треть водой. Закрыть ёмкость крышкой и, взбалтывая воду, растворить карбамид до исчезновения гранул.

ПРОВЕДЕНИЕ ТЕСТИРОВАНИЯ

Внимание: Нельзя закрывать рот или дуть в трубку. Слюна не должна попадать в трубку. Дышать следует ровно и спокойно. Язык к нёбу не прижимать.

Первое измерение: «АЭРОТЕСТ», базовый уровень по методике ХЕЛИК-тест.

3. Приоткрыть рот и поместить свободный конец индикаторной трубки, присоединенной к шприцу за верхние зубы, не прижимая к нёбу.

4. Через индикаторную трубку набрать в шприц 20 мл воздуха изо рта.

5. Затем трубку вынуть изо рта и отсоединить её от шланга.

6. Если цвет индикатора изменился, измерить длину тёмно-синего участка.

Второе измерение –нагрузочный уровень методики ХЕЛИК-тест

7. Привести поршень шприца в исходное положение. Присоединить трубку к шлангу другим концом.

8. Выпить раствор карбамида и начать отсчёт времени. Ополоснуть рот водой (15-25 мл.).

9. **Ровно через 3 минуты** приоткрыть рот и поместить свободный конец индикаторной трубки, присоединенной к шприцу за верхние зубы, не прижимая к нёбу.

10. Через индикаторную трубку набрать в шприц 20 мл воздуха изо рта.

11. Затем трубку вынуть изо рта и отсоединить её от шланга.

12. Если цвет индикатора изменился, измерить длину тёмно-синего участка.

Оценка результатов

13. Изменение цвета трубки при первом измерении (п.6) больше чем на 3 мм говорит об инфицировании патогенными HP и наличии гастродуоденита в активной фазе эрозивного состояния.

14. Если изменение цвета трубки после приема карбамида (второе измерение п. 12) на 2 мм и больше превышает изменение цвета при первом измерении (п. 6), то это свидетельствует об инфицировании HP.

15. Если изменение цвета трубки после приема карбамида (п. 12) на 6 мм и больше превышает изменение цвета при первом измерении (п. 6), то это говорит о совместном присутствии HP и Лямблий.

Методика обладает высокой чувствительностью и специфичностью (95-96 %). Она уникально проста в исполнении и надежна. От исполнителя не требуется специальных навыков. Единственным условием для получения достоверного результата является неукоснительное следование инструкции при выполнении диагностической аналитической процедуры. Её проведение не требует более пяти минут. Она на сегодня является самым простым и эффективным тестом для диагностики инфекции *Helicobacter pylori* и может широко использоваться, как для скрининга, так и для коррекции терапии. Для контроля терапии повторное тестирование желательно провести непосредственно сразу после прохождения назначенной терапии и еще одно - через 45 дней.