

# УРЕАЗНЫЕ ТЕСТЫ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ХЕЛИКОБАКТЕРИОЗА

**Милейко В.Е.,**

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

В 1984-86 году В.Ж. Marshall и J.R. Warren открыли этиопатогенную роль *Helicobacter pylori* в возникновении и развитии антрального гастрита и язвенной болезни. Впоследствии за это открытие они были удостоены звания лауреатов Нобелевской премии.

Под воздействием этого открытия само восприятие гастроэнтерологии, как науки, существенно изменились. Вследствие осознания этого открытия кардинально изменилась и терапия гастродуоденальных паталогий. Гастроэнтерология стала современной динамично развивающейся частью медицинской науки. Причем, для решения вопросов эффективной диагностики и лечения хеликобактериоза были задействованы существенные интеллектуальные и финансовые средства.

Несмотря на проблемы связанные с «перестройкой» к началу 2000 года в РФ практически были созданы и внедрены в широкую практику оригинальные диагностические методики, которые позволяют быстро и точно выявить присутствие *Helicobacter pylori* в организме человека.

Эти методики весьма разнообразны. Из них самые надежные и простые в исполнении построены на оценке уреазной активности бактерии. В основе этих инвазивных и неинвазивных методик лежит уникальная способность *Helicobacter pylori* синтезировать в огромных количествах высокоактивный фермент уреазу, что выделяет его из числа других бактерий продуцентов уреазы и дает возможность построить на этой основе селективные и высокочувствительные методики медицинской диагностики.

Первая из них по широте применения в медицинской среде – это методика диагностики по оценке уреазной активности биоптата. Анализ выполняется *in vitro*, после того, как биоптат получен инвазивно и травматично в ходе эндоскопического исследования. При выполнении квантифицированной прицельной биопсии этот диагностический метод достаточно достоверен и эффективен, как для первичной диагностики, так и для контроля терапии (эрадикации хеликобактера). В отечественной практике достаточно широко используется, так называемый «сухой» уреазный тест – ХЕЛПИЛ-тест (Helpil-test). Этот тест отличается от гелевого варианта – КЛО-теста (CLO-test), предложенного для этой цели Б. Маршалом, не только названием, но аналитическим подходом.

Следует отметить, что для оценки уреазной активности биологического образца традиционно применялись жидкие среды, содержащие карбамид (мочевину) и кислотно-основной индикатор с рН перехода близкой к нейтральной среде [1]. Большинство этих жидких сред содержало в своем составе фосфатный или цитратный буфер. Количество и состав буфера зачастую влияют не только на хранимость раствора, но и определяет характер кислотно-основного перехода индикатора и скорость срабатывания тест-системы. Причем, ионная сила раствора влияет и на характер цветового перехода, а тип и концентрация буфера в свою очередь влияет на активность фермента. Активность фермента, в том числе и уреазы *Helicobacter pylori*, существенно зависит и от рН среды.

Это делает подбор реакционной среды весьма щепетильным делом. Тем не менее, рецептуры на основе фосфатного или сложного составного буфера с консервантами (например, азид натрия [2]) или без таковых получили широкое распространение повсеместно [3]. Стандартизованные тест системы выпускались и выпускаются и сегодня, как в виде растворов, так и в виде гелевых таблеток. Промежуточным «двухкомпонентным вариантом» вариантом является «Де-Нол»® тест, где к лиофилизированному субстрату непосредственно перед тестированием добавляется жидкая фаза тест-системы, и уже в образовавшийся раствор помещается биоптат. Гелевые таблетки на раннем этапе существования в качестве загустителя содержали агар-агар. В настоящее время они изготавливаются главным образом на основе поливинилового спирта.

Наилучшими «жидкостными» тест-системами были стеклянные микро ампулы, заполненные раствором индикатора Фенолового красного в фосфатном буфере. Буфер был предварительно оттитрован до начала цветового перехода с бесцветного на красный (соломенно-желтая окраска). Ампулы заполнялись жидкостью в емкости с горячим раствором, а затем запаивались в стерильных условиях. В ходе применения носик ампулы обламывался и биоптат помещался в раствор индикатора непосредственно в ампуле. Уреазная активность оценивалась по времени появления малинового окрашивания. Такая тест-система с 1992 года по 1996 год выпускалась в Санкт-Петербурге компанией СТ «Синтана

Прозум» под моим авторским надзором. Методика позволяла достаточно быстро оценить уреазную активность биологического образца. Время оценки результата соответствовало 3-ем минутам (+++), 15-ти минутам (++) и 3-ем часам (+). За это время удавалось весьма достоверно установить наличие инвазии *Helicobacter pylori* с чувствительностью и селективностью 94-95%. Другие аналогичные тест-системы, включая и «гелевые», не превосходили описанную выше ампулированную тест-систему по реальной чувствительности, специфичности, времени срабатывания, хранимости и другим аналитическим и диагностическим характеристикам. Но аналогам жидкого уреазного теста в микро ампулах в продвижении на российский рынок мешала не только их высокая цена, но и низкая сохраняемость (специальные условия хранения), и необходимость термостатирования при температуре выше комнатной на сутки и более в ходе проведения самой аналитической реакции.

Именно поэтому перед инициативной группой разработчиков (в составе Дмитриенко М.А., Корниенко В.Е. и Милейко В.Е.) всталая новая задача: разработать простой в использовании высокоэффективный уреазный тест, который бы позволял не только быстро и эффективно анализировать жидкую фазу биоптата на уреазную активность, но и сохранить возможность использования того же самого биоптата для гистологических (морфологических) исследований по традиционным методикам. В начале 1997 года эта задача была успешно решена [4] созданием «сухого» уреазного теста на основе впитывающего волокнистого материала, субстрата и Бромтимолового синего в качестве хромогенного вещества [5]. Наилучшим материалом для теста, который с моей легкой руки, получил название ХЕЛПИЛ-тест, была «бумага» для биохимических тестов Малинской фабрики, которая вскоре закончилась из-за закрытия ее производства.

В основе превосходства методики ХЕЛПИЛ-тест над другими уреаз-

ными тестами лежит подход принципиально отличающий его от других тест систем. Во-первых, тест использует в качестве реакционной среды не стандартизованный раствор буфера, а как раз различную по свойствам межклеточную жидкость биоптата, которая отличается между собой по pH и содержанию уреазы. Бактерия сама производит удобную для анализа среду и незачем ее 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 ее (отбираемую жидкую фазу) усреднять по объему. Наоборот, чем больше биоптаты отличаются по содержанию межклеточной жидкости, тем больше ее впитывается в адсорбент и, следовательно, больше в количественном отношении поступает фермента для взаимодействия с субстратом. Третьим отличительным качеством теста является то, что индикатор в кислой форме является гидрофильным материалом и начинает растворяться только выше определенного pH. То есть его растворение в водной среде начинается только после стартового взаимодействия субстрата и фермента, причем 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 «жид-

ких» 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 неприщипки» умудрялись пропускать контрольное время.

Тест-система ХЕЛПИЛ выпускалась изначально в виде дисков с диаметром 4 или 5 мм и упаковывалась либо в пакеты, либо в пробирки. Анализ предполагалось проводить, либо на чашке Петри, либо контактом микро салфетки ХЕЛПИЛ-тест с биоптатом непосредственно в щипцах для биопсии до изъятия биоптата. В такой форме тест-системы под названием HelPil-test выпускаются и сегодня компанией ООО «Синтана СМ» (sintana.ru), так как упаковки по 50, 100 и 500 аналитических единиц (штук) пользуются достаточным спросом. Одновременно с выпуском дисков «в россыпь» появились различные дизайнерские варианты изделий. Так компания ООО «АМА» (с 1997 года по 2003 год), ООО «Синтана СМ» (с 1999 года по настоящий момент) и ООО «Ассоциация Медицины и Аналитики» (с 2003 года по настоящий момент) выпускали или продолжают выпускать тест-системы с различным креплением диска ХЕЛПИЛ на полимерную пленку в составе держателя из картона. Аналогичную продукцию под наименованием HelPil-tests, как и «жидкий» уреазный тест, выпускает SIA «MedPro», Латвия. С 2009 года ООО «Ассоциация Медицины и Аналитики» приступила к выпуску теста под названием ХЕЛПИЛ®-лента, где группа дисков закреплена на нейтральную по отношению к тест-системе ХЕЛПИЛ® клеевую основу.

К недостаткам методики можно отнести то, что тесты-системы ХЕЛПИЛ чувствительны к газовой среде, содержащей аммиак, и анализ, проводимый одновременно на близко расположенных тест-системах может привести к ложному срабатыванию одной из них. К «дизайнерским» недостаткам

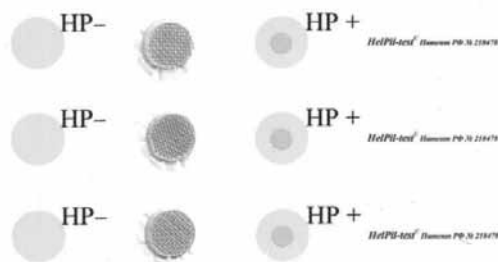
## ПЕРЕДОВЫЕ ТЕХНОЛОГИИ

можно отнести и то, что тест в контакте с другими материалами может утратить свои диагностические свойства или изменить аналитические характеристики. Например, ООО «Ассоциация Медицины и Аналитики» выпускает тест-системы на картонном носителе под названием ХЕЛПИЛ® бланк, ХЕЛПИЛ® стандарт и ХЕЛПИЛ® планшет. Диски ХЕЛПИЛ® при этом приходится изолировать от картона «клеевой» основой, так как сам картон не является стерильным материалом и как таковой уже содержит уреазу различного происхождения. В этом легко можно убедиться с помощью воды и уреазного теста. ООО «Синтана СМ» так же выпускает похожую модификацию теста под названиями HELPIL-тест 1, HELPIL-тест 3 (рис.1), HELPIL-тест 12 (цифры по числу дисков на бланке) на одну, три, и двенадцать аналитических единиц, соответственно. В этих тест-системах диск ХЕЛПИЛ закреплен непосредственно на прозрачный полимерный материал в круглом отверстии на краю носителя изготовленного из ламинированного картона. В таком варианте оформления тест-системы прозрачное окно позволяет оценить размеры и характер пятна под исследуемым материалом, не снимая биоптата с поверхности теста. Однако, спрос на эти системы на отечественном рынке не высок из-за их стоимости. Тест-системы, которые производит ООО «Синтана СМ» и ООО «Ассоциация Медицины и Аналитики», как в методике их использования, так и в конструк-

тивном решении тест-системы, являются похожими авторскими вариантами оригинального теста для выполнения методики ХЕЛПИЛ-тест. В тоже время эти тест-системы, не смотря на их внешнее сходство, не являются идентичными конструктивно и технологически, так как производятся из разных впитывающих материалов и из химического сырья отличного происхождения. Каждое из них выпускается с оригинальными технологическими «НОУ ХАУ». Последнее обуславливает их различную себестоимость и разнообразие выпусковых форм, а в конечном итоге и цену аналитической единицы в той или иной форме выпуска. Поэтому выбор остается за пользователем, то есть за врачом-эндоскопистом.

В завершение хотелось бы заметить, что кажущаяся простота конструкции тест-системы и неприязательность аналитической методики ХЕЛПИЛ-тест стимулирует не только широкое применение метода диагностики в реальном здравоохранении, но и прово-

### HELPIL - тест 3



**Работа с тестом:** Тест поместить на предметное стекло или чашку Петри. Биоптат поместить на поверхность теста (можно накрыть биоптат тестом, поместив его на предметное стекло). Зафиксировать время различного изменения цвета с желтого на синий в зоне контакта с биоптатом.

Если время изменения окраски меньше 3 минут, то тест положительный (HP+), если от 3 до 5 минут, то HP (±). Во всех других случаях тест отрицателен (HP-). Контролировать окраску более чем через 5 минут недопустимо.

партия № 118 Тест изготовлен 10.03.2011  
 Годен до 10.03.2016  
 ООО «Синтана СМ», С.-Пб, 8-812-3429664  
 E-mail: mileiko@mail.ru

Рис. 1.

Тест-система HELPIL-тест 3.

цирует изготовление подделок и имитаций не соответствующих по потребительским свойствам вышеописанным оригинальным запатентованным авторскими вариантам описанными выше. Это негативно влияет на ситуацию с распространением оригинальных тест-систем и вводит пользователей в заблуждение на предмет качества тестов и дееспособности оригинальной методики.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Григорьев П.Я., Исаков В.А., Розенталь В.М. и др., Авторское свидетельство СССР N 1564192 от 18.04.88 «Способ определения *Campylobacter pyloridis* при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки».
2. Сафонова Н.В., Жебрун А.Б. Гастрит, язвенная болезнь и хеликобактериоз. Рекомендации для врачей. – СПб, 1993. 40 с.
3. Аруин Л.И., Григорьев П.Я., Исаков В.А., Яковенко Э.П. Хронический гастрит, Амстердам, 1993, 362с.
4. Дмитриенко М.А., Корниенко Е.А., Милейко В.Е. Патент РФ N 2184781, С 12 Q 1/04, 1/00, «Способ диагностики хеликобактериоза по оценке уреазной активности биологического материала и устройство для его осуществления», опублик. 10.07.2002 Бюл. N 19, приоритет от 30.09.1997.
5. Корниенко Е.А., Гольбиц С.В., Милейко В.Е. и др. О диагностике инфекции *Helicobacter pylori* у детей. // Российский вестник перинатологии и педиатрии, 1998, N5, с 34.