

## Диагностика хеликобактериоза индикаторными трубками

Иванов А. В., ООО «Доктор Иванов»; Милейко В. Е., ООО «Синтана СМ», г. Санкт-Петербург

С момента возникновения биохимии как науки основным ее направлением стало изучение ферментативной активности различных препаратов и выделение энзимов в чистом виде. Первым ферментом, выделенным в кристаллическом виде, была уреазы — фермент, способствующий гидролизу мочевины. Одновременно с изучением ферментативной активности формировались и методики оценки этой активности химическими или физико-химическими методами. Одной из первых стандартизованных методик оценки ферментативной активности опять же стала методика оценки уреазной активности.

Различные уреазы всегда являлись объектом пристального внимания биохимиков не только как удобные модели для экспериментальной работы, но и как фермент, который всегда связывался с жизнедеятельностью конкретных микроорганизмов. При этом всегда было ясно, что часть бактерий, продуцентов уреазы, обладают болезнетворными свойствами по отношению к человеку или домашним животным. Причем сама уреазы как таковая, вне зависимости от происхождения, является токсином для теплокровных животных и в первую очередь для млекопитающих. Надо отметить, что карбамид (мочевина) синтезируется печенью человека и присутствует почти во всех биологических жидкостях организма человека как один из составных компонентов. Поэтому уреазная активность, присущая многим микроорганизмам, весьма не безобидна, так как эндогенная мочевина (карбамид) весьма активно гидролизуется в этих жидкостях на аммиак и углекислый газ (1) в присутствии уреазы микробного происхождения. При большой концентрации субстрата в присутствии фермента (уреазы) протекает интенсивный гидролиз карбамида, что и создает токсический эффект, а в конечном итоге приводит к гипераммонемии.

Следует отметить, что человек, как и другие теплокровные, уреазы не вырабатывает и к ее присутствию в своих биологических жидкостях фактически не готов. На состоянии здоровья человека пагубно сказывается как наличие самого фермента, так и присутствие продуктов его деструкции. Накопление этих веществ обычно приводит к необратимым изменениям в организме, так как их воздействие носит пролонгированный характер. Поэтому биохимические методики контроля уреазной активности биологических объектов всегда являлись и будут являться базовыми методиками для контроля и оценки бактериальной насыщенности и агрессивности изучаемой бактериальной среды.

Роль таких биохимических методик существенно возросла с открытием этиопатогенной роли *Helicobacter pylori* в развитии группы гастродуоденальных патологий, пародонтоза и сколиоза, она является весьма активным продуцентом уреазы. А уреазы обладает фантастической ферментативной активностью и вырабатывается этой бактерией в огромных количествах. Именно это свойство позволяет *Helicobacter pylori* противостоять антисептическому воздействию

кислой среды. Это свойство, присущее в первую очередь агрессивным штаммам *Helicobacter pylori*, является отличительным свойством этого микроорганизма. Именно оно создает возможность для его простой биохимической идентификации на фоне другой сходной бактериальной среды. Распространенность инфекции достаточно высока, а ее симптоматические проявления достаточно разнообразны как при первоначальном инфицировании, так и при хроническом течении болезни. В связи с этим сегодня наряду со старыми терминами (антральный гастрит, язвенная болезнь, гастродуоденит) стал широко употребляться термин **хеликобактериоз**.

**Что же это такое? Вот краткая справка:**

*Helicobacter pylori* — микроорганизм, выявленный в 80-х годах прошлого века. В течение 20 лет удалось доказать, что микроб является причиной хронического гастрита и язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. Первооткрыватели *Helicobacter pylori* в итоге получили Нобелевскую премию.

Позже узнали, что микроб вызывает рак желудка, МАЛТому желудка, некоторые заболевания кожи, например, хроническую крапивницу, нарушение всасывания микроэлементов и многое другое.

В разных странах мира микроб выявляется с различной частотой. Так, в США в семьях, где высокий уровень жизни был в нескольких поколениях, микроб почти вовсе не выявляется. В то же время, среди афроамериканцев США частота его встречаемости более 30%. Достаток семей японцев не связан с риском инфицирования, поскольку Япония пережила крах во Второй мировой войне, в отличие от жителей Северной Америки. Почти все японцы жили в течение нескольких лет в неблагоприятных гигиенических условиях.

**Инфекция *Helicobacter pylori* передается** через пищеварительный тракт (поступление микроба в пищевод через рот или через вдыхаемый воздух). Микроб выбирает местом своего жительства зубодесневые карманы рта и слизистую оболочку желудка.

**Основной источник инфекции** — инфицированные члены семьи.

**Риск заражения** при постоянном контакте с зараженным человеком у детей составляет 5—10% в год, то есть к 16 годам почти все контактирующие оказываются заражены.

**Взрослые не так сильно восприимчивы к *Helicobacter pylori***, поэтому часто бывает так, что один супруг инфицирован, а другой — нет.

Нам представляется, что лечить от *Helicobacter pylori* детей, если родители инфицированы, некорректно. Мы полагаем, что лечить детей при выявлении инфицирования стоит только тогда, когда одновременно лечатся контактирующие с ними члены семьи (все). Для взрослых людей вполне достаточно индивидуального лечения. Нет убедительных данных в необходимости обследовать и лечить домашних животных.

**Лечение инфекции *Helicobacter pylori*** заключается в применении 2—4 лекарственных препаратов.

**Международные 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 H<sub>2</sub>-гистаминовых рецепторов (циметидин, ранитидин, фамотидин), блокаторы протонной помпы, более эффективные, чем блокаторы H<sub>2</sub>-гистаминовых рецепторов (омепразол, ланцепазол и т. д.);
- препараты висмута: Де-Нол, бисмофальк;
- препараты нитроимидазола: трихопол (метронидазол), тинидазол и т. д.

**Стандартная схема для взрослых**

Амоксициллин (советуем флемоксин солютаб) 1000 мг утром и вечером через час после еды, одновременно клатритромицин 500 мг 2 раза в день через час после еды (или клацид CP 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 приеме 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, приемом капсул Бифидорм 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 также 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, то есть являются инвазивными, связаны с проникновением внутрь организма и неприятными 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 кислотной-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 неоправдан для контроля терапии. Для динамического наблюдени-

ния за пациентом и контроля эффективности 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. УВТ-методики (urea breath test) предполагают для таких исследований использование изотопных маркеров, и реакция ферментативного гидролиза происходит не с <sup>12</sup>C<sup>1</sup>H<sub>4</sub><sup>14</sup>N<sub>2</sub><sup>16</sup>O (карбамидом нормального изотопного состава), а с аналогами: <sup>13</sup>C<sup>1</sup>H<sub>4</sub><sup>14</sup>N<sub>2</sub><sup>16</sup>O, или <sup>14</sup>C<sup>1</sup>H<sub>4</sub><sup>14</sup>N<sub>2</sub><sup>16</sup>O, или <sup>12</sup>C<sup>1</sup>H<sub>4</sub><sup>15</sup>N<sub>2</sub><sup>16</sup>O. То есть эти методические подходы предполагают прием *per os* мочевины, меченой радиоактивным <sup>14</sup>C или стабильным <sup>13</sup>C, и контроль процесса ее гидролиза *in vivo* по содержанию изотопов углерода <sup>14</sup>C и <sup>13</sup>C в выдыхаемом CO<sub>2</sub>. 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 в Северной Америке и Европе распространены методы определения изотопов углерода <sup>14</sup>C и <sup>13</sup>C в выдыхаемом воздухе после приема пациентом меченой ими мочевины. Чувствительность этих методов достигает 96%, специфичность — 98%. Использование <sup>14</sup>C в детской практике ограничено ввиду его радиоактивности. Определение <sup>13</sup>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.

Таким образом, методы можно условно разделить на две группы: инвазивные — требующие проведения биопсии слизистой оболочки желудка при эндоскопическом исследовании и неинвазивные — не требующие биопсии.

## Методы диагностики хеликобактериоза

Инвазивные:	Неинвазивные:
Бактериологический	Серологический
Бактериоскопический	ПЦР
Гистологический	Биохимические уреазные тесты <i>in vivo</i> :
Биохимический	Дыхательные: а) изотопные по $^{13}\text{C}$ , $^{14}\text{C}^*$ (радиоактивен) б) по $\text{NH}_3$ (в воздухе ротовой полости)

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 мкКи мочевины, меченой  $^{14}\text{C}^*$ . 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 хиамина (вещества, связывающего  $\text{CO}_2$ ) в 2 мл спиртового раствора фенолфталеина. Обесцвечивание этого раствора свидетельствует о том, что он связал 2 ммоль  $\text{CO}_2$ . Затем к нему добавляют 10 мл сцинтиллята, содержащего толуен. Активность  $^{14}\text{C}^*$  измеряется жидкостным сцинтиллятором, в каждой пробе вычисляется процент содержания изотопа на ммоль  $\text{CO}_2$ . 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  $^{13}\text{C}$  сходна с вышеописанной, но если регистрацию  $^{14}\text{C}^*$  проводят с помощью сцинтиллятора, то для определения  $^{13}\text{C}$ , который не обладает радиоактивностью, требуется высокочувствительный газовый масс-спектрометр, который с высокой точностью может уловить микродозы  $^{13}\text{C}$  в выдыхаемом воздухе (0,03%). Однако перед исследованием необходимо исключить из диеты злаки и тростниковый сахар, так как они содержат  $^{13}\text{C}$  (Schoeller D.A., Klein P.D., Watkins J. et al., 1980). Пробный завтрак при проведении исследования должен иметь специальный состав (специальный ледник или мороженое), чтобы максимально замедлить эвакуацию из желудка (Klein P.D., Graham D.Y., 1989). Затем обследуемый принимает раствор, содержащий 250 мг  $^{13}\text{C}$ . Пробы выдыхаемого воздуха производятся через 20, 30, 40, 50 минут, плотно закрываются и транспортируются, содержание изотопа определяется с помощью масс-спектрометра (Schoeller D.A., Klein P.D., 1979), затем рассчитывается процент содержания изотопа в выдыхаемом воздухе с учетом площади поверхности тела (Haуcock G., Chir B., Schwartz G., Wisotsky D., 1978). Чувствительность и специфичность углеродного теста с  $^{13}\text{C}$  приближаются к таковым у теста с  $^{14}\text{C}^*$  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  $^{13}\text{C}$  абсолютно

безопасен, но требует использования чрезвычайно дорогого масс-спектрометра, стоимость которого доходит до 25000 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  $^{13}\text{C}$  в нашей стране стала применяться диодная лазерная спектроскопия (Ивашкин В. Т. с соавт., 1998).

В основе российского 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 *Helicobacter pylori* гидролизует его уреазой, вызывая усиленное образование углекислого газа и аммиака и, как следствие, нарастание концентрации  $\text{NH}_3$  в воздухе ротовой полости (выдыхаемом воздухе). На более 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/м<sup>3</sup> или концентрации  $\text{CO}_2$  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 содержание аммиака в воздухе ротовой полости 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, UBT- $\text{NH}_3$ -тест).

### Вариант методики

Сначала у каждого пациента натощак в воздухе ротовой полости измеряют «фоновую» концентрацию 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 сегодняшний день 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-12зо, ИТ- $\text{NH}_3$ , производитель ООО «Синтана СМ», ИТ $\text{NH}_3$ , производитель SIA MEDPRO) позволяют достоверно оценивать содержание аммиака в воздухе в интервале концентраций от 0,1 до 5,0 мг/м<sup>3</sup> и обнаруживать по уреазной активности крайне незначительные инвазии *Helicobacter pylori*.



Этот физико-химический метод анализа с использованием одноразовых индикаторных трубок (линейно-колористических газоанализаторов) широко используется в практическом здравоохранении. По простоте и скорости выполнения методики, надежности, специфичности, чувствительности и селективности получаемых результатов он всегда будет превосходить ряд более поздних разработок по «приборному» воплощению метода на основе обработки электрического сигнала электрохимических датчиков.

Кинетический метод, разработанный почти 20 лет назад для диагностики инфекционных заболеваний по аммиаку в выдыхаемом воздухе (воздухе ротовой полости) посредством индикаторных трубок (тогда это были индикаторные трубки ИТМ-12 производства ЧЗХР и ИТМ-12эо производства СТ «Синтана Прозум») достаточно отработан и усовершенствован до весьма удобной и простой методики определения инфекции *Helicobacter pylori*. Диагностика проводится без прямого контакта с бактерией, что тоже немаловажно для реальной медицинской практики. Все разработанные аналитические тест-системы являются технологически воспроизводимыми и имеют высокие метрологические характеристики. Одним из авторов первоначальной разработки, Корниенко Е. А., в 1999 году защищена докторская диссертация на тему: «Клиника, диагностика и лечение гастродуоденальной патологии, ассоциированной с инфекцией *Helicobacter pylori*, у детей».

Метод анализа с использованием одноразовых индикаторных трубок постоянно совершенствуется как в плане улучшения методики применения индикаторных трубок, так и в плане конструкции самих линейно-колористических одноразовых газоанализаторов — индикаторных трубок.

Поэтому сегодня на рынке появился набор **ГАСТРО-тест**. Этот простой набор для выполнения «дыхательной» диагностики *Helicobacter pylori* производится ООО «Синтана СМ» по заказу ООО «Доктор Иванов» и предназначен для использования непосредственно обследуемым.

Методика является комплексной и включает в себя обобщенный вариант различных диагностических подходов, эффективно использовавшихся в разные годы для диагностики гастродуоденальной патологии, ассоциированной с *Helicobacter pylori*.

### **Методика по выполнению неинвазивной методики GASTRO-тест: комплексная методика UBT-NH<sub>3</sub> 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 желтого на синий. Этапы тестирования: анализ содержания аммиака в воздухе ротовой полости и оценка состояния обследуемого («АЭРОТЕСТ»); анализ содержания аммиака в воздухе ротовой полости после приема карбамида и оценка состояния обследуемого по отличию первого и второго показателя теста (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 емкости на 50 мл, одноразовый стаканчик, инструкция.

**Дополнительно потребуются:** часы, линейка, питьевая вода.

#### **Подготовка к тестированию.**

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

2. Открыть емкость с карбамидом и заполнить ее на одну треть водой. Закрыть емкость 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 небу 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 небу.

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

5. Трубку вынуть изо рта и отсоединить от шланга.

6. Если цвет индикатора изменился, измерить длину темно-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 отсчет 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 небу.

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

11. Трубку вынуть изо рта и отсоединить от шланга.

12. Если цвет индикатора изменился, измерить длину темно-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 более 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, проста в исполнении. Ее проведение не требует более пяти минут. Она на сегодня является самым простым, надежным и эффективным тестом 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.