

Быстрые сухие уреазные тесты для диагностики хеликобактериоза

В. Е. Милейко, ООО «Синтана СМ», г. Санкт-Петербург

В 1984—1986 гг. Барри Маршалл и Робин Уоррен установили, что в возникновении и развитии антрального гастрита и язвенной болезни этиопатогенную роль играет бактерия *Helicobacter pylori*. Впоследствии за это открытие они были удостоены звания лауреатов Нобелевской премии.

Благодаря этому открытию существенно изменилось само восприятие гастроэнтерологии как науки. Кардинально изменилась и терапия гастродуodenальных патологий. Гастроэнтерология стала современной, динамично развивающейся частью медицинской науки, причем для решения вопросов эффективной диагностики и лечения хеликобактериоза были задействованы значительные интеллектуальные и финансовые средства.

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

Эти методики весьма разнообразны. 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 ее из числа других бактерий — продуцентов уреазы и дает возможность создать на этой основе селективные и высокочувствительные методики медицинской диагностики.

Первая из них по широте применения в медицинской среде — 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 квалифицированной прицельной биопсии этот диагностический метод достаточно достоверен и эффективен

как для первичной диагностики, так и для контроля терапии (эррадикации хеликобактера). В отечественной практике достаточно широко используется так называемый «сухой» уреазный тест — методика ХЕЛПИЛ-тест тест-системы ХЕЛПИЛ® (HelPIL-test, HELPIL-тест, HELPIL-test, патент РФ №2184781). Этот тест отличается от гелевого варианта КЛО-теста (CLO-test), предложенного для этой цели Б. Маршаллом, не только названием, но и аналитическим подходом.

Следует отметить, что для оценки уреазной активности биологического образца традиционно применялись жидкие среды, содержащие карбамид (мочевину) и кислотно-основной индикатор с pH 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 определяют характер кислотно-основного перехода индикатора и скорость срабатывания тест-системы. Причем ионная сила раствора влияет на характер цветового перехода, а тип и концентрация буфера, в свою очередь, — на активность фермента. Активность фермента, в том числе уреазы *Helicobacter pylori*, существенно зависит и от pH 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 [3]. Стандартизованные тест-системы выпускались и сегодня выпускаются как в виде растворов, так и в виде гелевых таблеток. Промежуточным, «двуухкомпонентным», вариантом является «Де-Нол»®-тест, где к лиофилизированному субстрату непосредственно перед тестированием добавляется жидкость фаза тест-системы, и уже в об разовавшийся раствор помещается биоптат.

Наилучшими «жидкостными» тест-системами были стеклянные микроампулы, 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 процессе применения носик ампулы отламывался, и биоптат помещался в раствор индикатора непосредственно в ампуле. Уреазная активность оценивалась по времени появления малинового окрашивания. Такая тест-система выпускалась с 1992 по 1996 годы в Санкт-Петербурге компанией СТ «Синтана Прозум». Данная методика позволяла достаточно быстро оценить уреазную активность биологического образца. Время первой оценки результата соответствовало трем минутам (+++), пятнадцати минутам (++) и трем часам (+). За время, не превышающее трех часов, и без термостатирования и другого специального оборудования удавалось весьма достоверно установить наличие инвазии *Helicobacter pylori* с чувствительностью и селективностью 94—95%. Другие аналогичные тест-системы, включая «гелевые», не превосходили описанную выше ампулированную тест-систему по реальной чувствительности, специфичности, времени срабатывания, хранимости и другим рабочим, аналитическим и диагностическим характеристикам. Однако аналогам жидкого уреазного теста в микроампулах в продвижении на российский рынок мешала не только их высокая цена, но и низкая сохраняемость (требовались специальные условия хранения), потребность в термостатировании при температуре выше комнатной на сутки и более в ходе проведения самой аналитической реакции.

Именно поэтому перед инициативной группой разработчиков (Дмитриенко М. А., Корниенко В. Е. и Милейко В. Е.) встала новая задача:

разработать простой в использовании и высокоеффективный уреазный тест, который позволял бы 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] путем создания «сухого» уреазного теста (далее по тексту — тест-система *HelPil-test*) на основе впитывающего волокнистого материала, субстрата и бромтимолового синего в качестве хромогенного вещества [5]. Наилучшим материалом для тест-системы была «бумага» для биохимических тестов Малинской фабрики.

В основе превосходства **методики ХЕЛПИЛ-тест** (первоначальное авторское название тест-системы и методики его применения) над другими уреазными тестами лежит аналитический подход, который принципиально отличает *HelPil-test* от других тест-систем.

Во-первых, *HelPil-test* 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, ее незачем 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; отбираемую жидкую фазу незачем усреднять по объему. Наоборот, — чем больше биоптаты отличаются по содержанию межклеточной жидкости, тем больше ее впитывается в адсорбент и, следовательно, больше фермента в количественном отношении поступает для взаимодействия с субстратом.

Третим отличительным качеством тест-системы *HelPil-test* является то, что кислотно-основной индикатор в кислой форме является гидрофильным материалом и начинает растворяться только выше определенного pH. То есть растворение индикатора 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 *HelPil-test* 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 *HelPil-test* позволил сократить время аналитической реакции более чем в 10 раз по сравнению с самыми быстрыми вариантами «жидких» тестов. Контрольными точками в методике *HelPil-test* стали 30 секунд, 1 минута и 3 минуты. При этом следует отметить, что тест-система *HelPil-test* является быстродействующей и уже через 5 минут после начала аналитической реакции тест становится непригодным для оценки инвазии *Helicobacter pylori*. Такие сроки выполнения методики ХЕЛПИЛ-тест могут привести к диагностическим ошибкам, потому что некоторые пользователи «с не-привычки» умудряются пропускать контрольное время, рекомендованное в экспресс-методике для оценки степени инвазии *Helicobacter pylori*.

Тест-система *HelPil-test* изначально выпускалась в виде дисков диаметром 4 или 5 мм и упаковывалась в пакеты или в пробирки. Анализ предполагалось проводить либо на чашке Петри, либо путем контакта микро салфетки *HelPil-test* с биоптатом непосредственно в щипцах для биопсии до изъятия биоптата. В такой форме тест-системы под названием *HelPil-test* и сегодня выпускаются компанией ООО «Синтана СМ» (сайт компании www.sintana.ru), так как упаковки по 50, 100 и 500 аналитических единиц (штук) пользуются достаточным спросом. Одновременно с выпуском дисков *HelPil-test* «в россыпь» появились различные дизайнерские варианты изделий. Так, компании ООО «АМА»

(с 1997 по 2003 год), ООО «Синтана СМ» (с 1999 года по настоящее время) и ООО «Ассоциация Медицины и Аналитики» (с 2003 года по настоящее время) выпускали или продолжают выпускать тест-системы *HelPil-test* с различным закреплением диска *HelPil-test* на полимерной пленке 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® — kleевую основу.

К недостаткам методики можно отнести то, что эти тесты-системы чувствительны к газовой среде, содержащей аммиак, и анализ, проводимый одновременно на близко расположенных друг к другу тест-системах, может привести к ложному срабатыванию одной из них. К «дизайнерским» недостаткам можно отнести и то, что в контакте с другими материалами тест 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, которая обладает достаточно высокой ферментативной активностью. В этом легко можно убедиться с помощью воды и уреазного теста *HelPil-test*. ООО «Синтана СМ» также выпускает похожие модификации теста под названиями «HELPIL-тест 1», «HELPIL-тест 3» (рис. 1), «HELPIL-тест 12» (цифры обозначают число дисков на бланке), соответственно, на одну, три и двенадцать аналитических единиц.

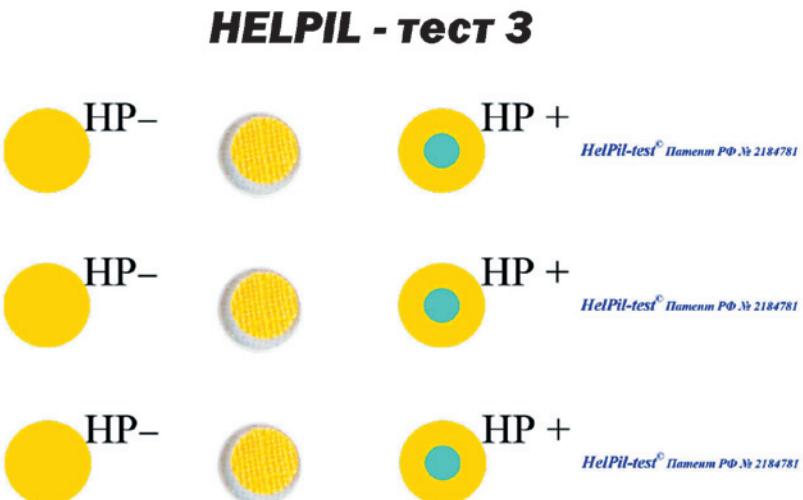
В этих тест-системах диск *HelPil-test* закреплен непосредственно на прозрачном полимерном материале в круглом отверстии на краю носителя, изготовленного

остается за пользователем, то есть за врачом-эндоскопистом.

В завершение хотелось бы отметить, что кажущаяся простота конструкции тест-системы и непрятательность аналитической методики ХЕЛПИЛ-тест стимулирует не только широкое применение данного метода диагностики в реальном здравоохранении, но и провоцирует изготовление подделок и имитаций, не соответствующих по потребительским свойствам оригинальным запатентованным авторским вариантам, описанным выше. Это негативно влияет на ситуацию с распространением оригинальных тест-систем HelPil-test и вводит пользователей в заблуждение на предмет качества тестов и деспособности оригинальной методики ХЕЛПИЛ-тест.

Литература

1. Григорьев П. Я., Исаков В. А., Розенталь В. М. и др. Авторское свидетельство СССР от 18.04.88 №1564192 «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. — 362 с.
4. Дмитриенко М. А., Корниенко Е. А., Милейко В. Е. Способ диагностики хеликобактериоза по оценке уреазной активности биологического материала и устройство для его осуществления. — Патент РФ №2184781, С 12 Q 1/04, 1/00, опубл. 10.07.2002 Бюл. №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. — №5. — С. 34.



Работа с тестом: Тест поместить на предметное стекло или чашку Петри. Биоптат поместить на поверхность теста (можно накрыть биоптатом тестом, поместив его на предметное стекло). Зафиксировать время различимого 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

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 невысок из-за их большой стоимости.

Тест-системы *HelPil-test*, которые производят ООО «Синтана СМ» и ООО «Ассоциация Медицины и Аналитики», являются схожими авторскими вариантами оригинального теста [4] как в методике их использования, так и в конструктивном

решении тест-системы. В то же время эти тест-системы, несмотря на их внешнее сходство, не являются идентичными конструктивно и технологически, так как производятся из разных впитывающих материалов и разного химического сырья. Каждое из них выпускается с оригинальными технологическими ноу-хау. Последнее обуславливает их различную себестоимость и разнообразие выпускаемых форм, а в конечном итоге — цену аналитической единицы в той или иной форме выпуска. Поэтому выбор