

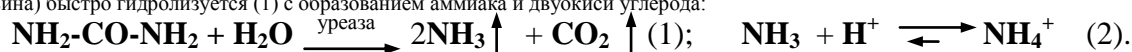
НЕИНВАЗИВНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ *HELICOBACTER PYLORI*

Кафедра педиатрии ФУВ (зав. Проф. Н.П.Шабалов) Санкт-Петербургская Государственная Педиатрическая медицинская академия, ООО «АМА», ООО «ЛБМ», Санкт-Петербург, Россия

РЕЗЮМЕ:

В статье приведены результаты клинических испытаний разработанных авторами неинвазивных методов диагностики НР-инфекции. В основе методов лежит оценка кинетики гидролиза мочевины, принятой внутрь, по нарастанию концентрации аммиака в выдыхаемом воздухе. Обследовано 203 пациента в возрасте от 5 до 16 лет с различными заболеваниями желудка и 12-перстной кишки и 21 здоровый ребёнок. Результаты дыхательных методов сопоставлены между собой и с данными уреазного теста и гистологического исследования. Доказана высокая чувствительность и специфичность предложенных методик. Показана информативность дыхательных методов в оценке эффективности антихеликобактериозной терапии.

Хронические заболевания желудка и двенадцатиперстной кишки в большинстве случаев ассоциированы с этиопатогенной ролью *Helicobacter pylori* (НР) - грамтрицательной скрученной S-образной бактерии, существующей, главным образом, под слоем желудочной слизи и интенсивно продуцирующей высокоактивную уреазу [1,5]. Традиционные методы диагностики НР инфекции [1,5]: бактериологический, гистологический, биохимический (уреазный тест) сопряжены с эндоскопическим исследованием и взятием биоптата. Но они являются травматичными, инвазивными и неприемлемы для частого повторного использования у больного. Для динамического наблюдения за пациентом и контроля эффективности терапии необходимы простые и удобные, неинвазивные методы. Этим требованиям отвечают травматичные серологические и атравматичные, выполняемые *in vivo*, биохимические методики. В основе последних - определение продуктов каталитического гидролиза мочевины (карбамида) в выдыхаемом воздухе [1,12] или моче [1]. Когда уреазы НР присутствует в желудке, субстрат (мочевина) быстро гидролизуется (1) с образованием аммиака и двуокиси углерода:



Однако мочевина присутствует во всех биологических жидкостях человека, а углекислый газ - в выдыхаемом воздухе. Поэтому зарубежные методики («urea breath test») в качестве нагрузки предполагают прием мочевины, меченной изотопными маркерами: радиоактивным ^{14}C или стабильным ^{13}C и контроль процесса ее гидролиза по содержанию изотопов углерода ^{14}C и ^{13}C в выдыхаемом CO_2 [7,8,10]. Методики являются усложненными вариантами биохимического уреазного теста. Их чувствительность достигает 96-99 %, а специфичность - 98 % [7,10]. Но использование радиоактивного ^{14}C в детской практике ограничено, а определение ^{13}C связано с эксплуатацией дорогостоящего масс-спектрометра.

Поэтому целью данной работы было создание информативного, простого, удобного и недорогого неинвазивного метода диагностики НР пригодного для контроля терапии.

Материалы и методы

Для контроля содержания аммиака в воздухе (С) применили методики выполнения измерений с использованием индикаторных трубок (ИТ) [11] производства ООО «АМА» и спектрометр ионного дрейфа (СИД) [11] производства ООО «ЛБМ» Санкт-Петербург.

Через ИТ заполненную хемосорбентом (бромфеноловый синий на силикагеле КСК кислотной обработки с размером зерен 0,16-0,25 мм) прокачивается с помощью электромеханического или ручного аспиратора два литра воздуха из ротовой полости пациента. Аналитическая реакция происходит во время отбора пробы и оценка С производится по длине слоя адсорбента изменившего окраску. При использовании серийных стандартизованных ИТ каждый мм миллиметр слоя наполнителя, изменившего окраску, соответствует 0,3 мг/м³, а общая погрешность для С от 0,3 до 0,9 мг/м³ составляет 30 %.

Для того, чтобы получить информацию о кинетике гидролиза мочевины *in vivo* по изменению С в выдыхаемом воздухе мы использовали высокочувствительные ИТ и СИД. Спектрометр обладает быстродействием и позволяет моментально оценить количество каких-либо веществ в воздухе, автоматически аспируемом его системой пробоотбора СИД. Метод ион-дрейфовой спектрометрии (ИДС) основан на том, азот воздуха, ионизированный β -излучением от ^{63}Ni (изолированного от контакта с человеком и достаточно безопасного никелевого источника), взаимодействует с примесями в камере реактора, образуя ионные кластеры. В случае NH_3 это ионные кластеры $(\text{H}_2\text{O})_n\text{NH}_3^+$. Слабоионизированная плазма, состоящая из частиц импульсно эжектируется в дрейфовую камеру, где ионные кластеры дифференцируются по подвижности в электрическом поле. Измерение ионных токов в конце дрейфовой камеры позволяет получить представление о составе примесей в анализируемом воздухе. Токи регистрируются и анализируются СИД, воспроизводятся на мониторе компьютера в виде группы спектров и дифференциальной гистограммы (Рис. 1). На спектрах воздуха, выдыхаемого пациентом, виден пик иона-реагента и характерные изменения, обусловленные наличием небольших количеств аммиака.

Для отработки диагностических критериев нами обследовано 224 ребенка в возрасте от 5 до 16 лет. Всем обследуемым параллельно проводили гистологическое исследование и уреазный тест биоптатов слизистой оболочки желудка и 12-перстной кишки. У 203 выявлены различные формы гастродуоденальной патологии, а 21 составил контрольную группу, где не выявлено клинических и эндоскопических признаков поражения верхних отделов желудочно-кишечного тракта.

Результаты и их обсуждение

В отечественной практике нашел применение "Аэротест"[4,11,13]. Он основан на определении естественного содержания аммиака в воздухе ротовой полости (фоновой концентрации - C_1) без внесения мочевины извне. Обычно C_1 регистрируют с помощью высокочувствительных ИТ, как среднюю величину текущих концентраций за время анализа (τ). В качестве параметра, свидетельствующего об инвазии НР (НР+), для методики «Аэротест» была выбрана C_1 , превышающая 0,8 мг/м³. Этот диагностический критерий был рассмотрен без учета метрологических характеристик газоаналитической методики. Это существенно ухудшило характеристики медицинской диагностической методики [2].

Модификация "Аэротест" приемом бикарбоната натрия [11] делает результат исследования более наглядным, так как NaHCO_3 , вследствие нейтрализации соляной кислоты в желудке, приводит к сдвигу кислотно-основного равновесия (2) и высвобождению аммиака из аммонийных солей. Через 1-2 минуты после приема 5 г бикарбонат натрия C_1 временно

увеличивается в 2-3 раза и нормализуется через 20-40 минут. Поэтому тест с бикарбонатом натрия отличается более высокой чувствительностью, но также не является строго специфичным.

Исследования показали, что C_1 зависит не только от инвазии НР, но и от ряда других факторов: особенностей азотистого обмена, желудочной секреции, функционального состояния печени, активности уреазопродуцентов кишечного биоценоза. Полученные нами данные свидетельствуют о низкой чувствительности и специфичности метода (менее 60%) по сравнению с результатами гистологических и серологических (ELISE) исследований [11]. Следовательно, использование метода "Аэротест" в широкой практике нецелесообразно.

Нами разработан биохимический тест измерения уреазной активности *in vivo* (ХЕЛИК-тест). Он основан на оценке прироста концентрации аммиака (ΔC) в воздухе ротовой полости после приема пациентом мочевины нормального изотопного состава $^{12}C \ ^{14}N_2 \ ^{16}O$ [3]. Мочевина быстро гидролизует под действием уреазы НР и вызывает изменение содержания аммиака в воздухе.

Для оценки скорости этого процесса мы изучили характер изменения концентрации аммиака в воздухе ротовой полости после приема мочевины (C_2) у 26 пациентов. Результаты измерений концентрации аммиака в течение 20-40 мин со сменой индикаторных трубок каждые 3 мин. показали, что у явно инфицированных больных существенное увеличение C_2 отмечается уже на третьей минуте, достигает максимума через 6-10 мин и снижается до фонового уровня через 25-30 мин (рис. 2). Руководствуясь этими результатами при проведении ХЕЛИК-теста, C_2 рекомендуется измерять и оценивать со 2-ой по 12-ую минуту.

Для оценки зависимости C_2 от τ от дозы мочевины мы провели исследования у добровольцев с многократным приемом 200 мг, 500 мг, 1 г и 2 г мочевины. Чтобы исключить влияние других возможных факторов, в частности, пищевых, исследование проводили натощак. При повторном приеме одной и той же дозы мочевины одним и тем же пациентом зависимость воспроизводилась. Большей дозе соответствовало большее $\Delta C = C_1 - C_2$. Таким образом, при проведении теста необходима точная дозировка количества мочевины. Значимое ΔC без каких-либо неприятных ощущений у больного создает 500 мг. Приведенные ниже нормативы представлены именно для этого оптимального количества.

Для отработки этих нормативов мы сопоставили данные, полученные с помощью СИД, с данными по ИТ у 124 пациентов с различными вариантами гастродуоденальной патологии и сравнили их с аналогичными показателями 18 детей контрольной группы.

Мы использовали СИД для того, чтобы детально изучить изменение моментальных C_2 . Методика, позволяющая судить об этом, выглядела следующим образом. Первоначально регистрировали спектр окружающего воздуха и C_1 , как среднюю величину из трех моментальных измерений. После чего пациент принимал 500 мг мочевины нормального изотопного состава в 15-20 мл дистиллированной воды и ополаскивал рот водой. Затем каждые 30 с в течение 20-40 мин регистрировали мгновенные значения C_2 .

Исследования, проведенные с помощью ИДС, показали, что увеличение содержания аммиака после приема мочевины фиксируется на выдохе. Это свидетельствует о выделении аммиака с выдыхаемым воздухом. Увеличение C_2 обычно наблюдается через 2-3 мин с момента приема мочевины и зависимость C_2 от τ может иметь несколько максимумов, быть более крутой или более пологой. Профиль кинетических кривых для усредненных значений C_2 , полученных с помощью ИДС, в целом соответствовал зависимостям установленным с помощью ИТ.

У детей контрольной группы существенного увеличения текущих C после приема мочевины не наблюдалось. Те же данные получены при обследовании пациентов страдающих гастродуоденальной патологией у которых НР не был обнаружен традиционными диагностическими методиками (НР-). У всех НР(+) больных получено отчетливое нарастание концентрации аммиака после приема мочевины, характеризующееся высокими моментальными значениями с 3-ей по 12-ую мин. Профиль кинетической зависимости C_2 от τ имел один или несколько максимумов. Наиболее высокие (пиковые) величины C_2 получены у некоторых больных язвенной болезнью.

Анализ полученных зависимостей позволяет упростить процедуру исследования для применения в широкой практике с использованием ИТ. Один из упрощенных и апробированных вариантов диагностической методики ХЕЛИК-тест может выглядеть так.

Сначала у каждого пациента натощак измеряют C_1 . Затем обследуемый принимает 500 мг мочевины в 15-20 мл дистиллированной воды и прополаскивает рот водой. Через 2 минуты после приема мочевины в течение 10 минут у пациента отбирают воздух из ротовой полости и оценивают C_2 . Оценка проводится по нарастанию длины окрашенного столбика в индикаторной трубке после приема мочевины, 1 мм длины столбика равен 0,3 мг/м³.

У детей контрольной группы средняя величина $C_1 = (0,3 \pm 0,1)$ мг/м³, $C_2 = (0,4 \pm 0,2)$ мг/м³, при среднем приросте концентрации $\Delta C = (0,10 \pm 0,05)$ мг/м³. У НР-негативных (НР-) больных с различными вариантами хронического гастрита C_1 в среднем составила $(0,4 \pm 0,2)$ мг/м³, C_2 составила $(0,6 \pm 0,2)$ мг/м³, а $\Delta C - (0,2 \pm 0,1)$ мг/м³, что мало отличается от показателей контрольной группы ($P > 0,1$).

У детей с НР-ассоциированной гастродуоденальной патологией C_1 составила $(0,5 \pm 0,2)$ мг/м³, что мало отличается от показателей контрольной группы. Причём у 60% НР+ больных этой группы C_1 не превышала 0,5 мг/м³ – минимального норматива для модификации «Аэротеста» [3]. После приема мочевины у всех НР+ пациентов отмечалось существенное нарастание содержания аммиака в воздухе ротовой полости: C_2 составила $(1,7 \pm 0,3)$ мг/м³, $\Delta C - (1,2 \pm 0,3)$ мг/м³. Различия между показателями (C_2 и ΔC) для НР+ обследуемых и аналогичными показателями для пациентов контрольной группы и НР- достоверны ($P < 0,01$).

Сопоставление индивидуальных C_1 и C_2 у каждого больного не выявило зависимости величины нагрузочных показателей от исходных. Корреляция между ними отсутствовала. Таким образом, именно прирост концентрации аммиака в воздухе ротовой полости и её абсолютные значения после приема мочевины могут служить достоверными критериями инфицированности НР.

На основании полученных данных нами отработаны нормативы ХЕЛИК-теста: результат считается положительным, если после приема 500 мг мочевины средневзвешенная или моментальная C_2 превышает 0,9 мг/м³ при ΔC более 0,5 мг/м³.

При сопоставлении с другими методами диагностики: гистологическим и уреазным тестом, ХЕЛИК-тест оказался весьма информативным. Его чувствительность составила 97 %, а специфичность - 96 %.

У всех обследованных результаты ИДС сопоставлены с данными уреазного теста и гистологического исследования, сопоставление показало высокую чувствительность и специфичность методики -98%. Сопоставление результатов двух существенно отличающихся между собой аналитических методик (ИДС и ИТ) в рамках диагностического метода ХЕЛИК-тест, выявило принципиальное совпадение результатов в абсолютном большинстве случаев. Коэффициент корреляции составил -0,9. Неполное совпадение результатов полученных с помощью СИД и ИТ объясняется тем, что результат измерения C_2 посредством ИТ отражает усредненный показатель за время исследования, а величина C_2 , измеренная СИД оценивает кинетику гидролиза мочевины по группе моментальных значений C_2 . Поэтому при кратковременном повышении C_2 , наблюдавшемся у ряда НР+ больных, интегральные показатели C_2 , измеренные ИТ, ниже пиковых значений C_2 по ИДС. С другой стороны, дискретность измерения C_2 СИД требует проведения отбора пробы воздуха строго на выдохе, что не всегда удаётся у детей.

Мы проследили за изменениями показателей ХЕЛИК-теста (ИДС и ИТ) в ходе курса антихеликобактериозной терапии у 58 больных с различными вариантами НР-ассоциированных гастродуоденальных заболеваний. Оценка проводилась на 7, 14 день терапии и через 4 недели после окончания курса лечения. При неэффективности терапии C_2 оставалась высокой при каждом обследовании. Часто на фоне лечения происходило снижение или нормализация показателей, что свидетельствовало о подавлении НР. Окончательный вывод об эффективности терапии можно было сделать только через 4 недели после её

завершения: в случаях эрадикации НР С₂, измеренная ИТ, оказывалась в пределах нормы, а спектры не фиксировали значимых моментальных показателей. Это находилось в соответствии с отрицательным результатам уреазного теста и гистологического исследования.

Выводы

ХЕЛИК-тест является простым и информативным методом диагностики НР и пригоден, как для первичного обследования и динамического наблюдения за больным, так и контроля терапии.

Высокие значения чувствительности (97 %) и специфичности (96 %) ХЕЛИК-теста соответствуют таковым у зарубежных дыхательных тестов [7,8,10]. Предложенная нами кинетическая методика оценки скорости ферментативного гидролиза мочевины *in vivo* по диагностическим результатам оценки уреазной активности НР совпадает с результатами быстрого углеродного дыхательного теста [6,9].

В отличие от зарубежных углеродных дыхательных тестов варианты ХЕЛИК-теста не требуют использования радиоактивных или других изотопных маркеров. Метод прост, дешев, не требует специальной подготовки и дорогостоящей аппаратуры, результат оценивается непосредственно в ходе исследования, что позволяет максимально быстро назначить необходимое лечение. Простота, информативность и доступность ХЕЛИК-теста делают его весьма перспективным для широкого внедрения в медицинскую практику.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ:

1. Аруин Л.И., Григорьев П.Я., Исаков В.А., Яковенко Э.П. Хронический гастрит.- Амстердам, 1993.
2. Корниенко Е.А., Милейко В.Е.// Диагностика и лечение.- Архангельск, 1996, II(12), с 31- 33.
3. Милейко В. Е., Сафонова Н.В., Жебрун А.Б. и др.// Актуальные проблемы инфекционной патологии.-СПб, 1993.-С. 43.
4. Корниенко Е.А., Милейко В.Е., Фаина С.А., Нажиганов О.Н.//Фарминдекс.-1997.-№ 20(36).-С А-29 – А-30.
5. Сафонова Н.В., Жебрун А.Б. Гастрит, язвенная болезнь и хеликобактериоз.- СПб,1993.
6. Байбаков Ф.Б., Шарапов В.М. Контроль примесей в сжатых газах.-М.,1989.
7. Hamlet A.K., Erandsson K.I.M., Olbe L. et al.// Scandinv. J. Gastroenterol.-1995.- Vol. 30, №. 11.- P. 1058-1063.
8. Hill H.H., Siems W. F., St. Louis R. H., McMinn D.G.//Analytical Chemistry.-1990.-Vol. 62,№ 23.- P. 1201 A – 1209 A.
9. Kornienko E., Vashkevich O., Samokish V.//Abstracts of International Congress on Analytical Chemistry.-Moscow,1997-P. P-37.
10. Logan R.P.H., Dill S., Bauer F.E. et al.// Eur. J. Gastroenterol. Hepatol.-1991.-Vol. 3.-P. 915-921.
11. Marshall B.J., Surveor I.// J. Nucl. Med. – 1988.- Vol. 29.- P. 11-16.
12. Perua D.A., Pambianco D.J., Dye K.R. et al. //Am. J. Gastro.- 1996.-Vol. 91, № 2. - P. 233-238.
13. Safonova N.V., Meelaiko V.E., Zhebrun A.B. et al //Helicobacter pylori and the new concepts in gastro-duodenal diseases.-Prague, 1992.- P. P-3.
14. Walsh J.H., Peterson W.L.// New England J. Med. – 1995.- Vol. 333, №15.- P. 984-991.
15. Zhebrun A.B., Safonova N.V., Mileiko V.E. et al. //Acta Gastroenterol. Belg.- 1993.- Vol.. 56.- P. 8.