

## РАЗРАБОТКА МОДИФИЦИРОВАННОГО НЕИНВАЗИВНОГО МЕТОДА ДИАГНОСТИКИ *HELICOBACTER PYLORI*

Цодиков Г.В.<sup>1</sup>, Зякун А.М.<sup>2</sup>, Морозова Н.А.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>МОНИКИ им. М.Ф. Владимирского, email: [tsodikmoni07@rambler.ru](mailto:tsodikmoni07@rambler.ru)

<sup>2</sup>Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К.Скрябина РАН

Представлена технология модифицированного уреазного дыхательного теста с <sup>13</sup>C-мочевинной и доказательства ее диагностической точности. В основе - добавление к <sup>13</sup>C-мочевине лимонной кислоты с низким содержанием природного <sup>13</sup>C-изотопа.

Инфицированность *Helicobacter pylori* (Hр) взрослого населения России составляет 70-92% [1,2]. С Hр связывают развитие хронических воспалительных и эрозивно-язвенных поражений верхнего отдела желудочно-кишечного тракта. Для большинства отечественных лечебных учреждений «золотым» стандартом остается морфологический метод исследования, чувствительность и специфичность которого составляет 90-95% [3], а достоверность его повышается на 5% с изучением каждого дополнительного биоптата. В стремлении предупредить ятрогенный путь передачи инфекции, избавить пациента от необходимой повторной эндоскопии с биопсией слизистой оболочки предпочтение отдается неинвазивным методам детекции Hр, к которым относится <sup>13</sup>C-уреазный дыхательный тест (УДТ) [3]. В основе метода лежит регистрация возрастающего «количества» <sup>13</sup>CO<sub>2</sub> в выдыхаемом воздухе после приема мочевины, содержащей повышенное количество стабильного <sup>13</sup>C - изотопа по сравнению с его природным содержанием в организме.

Данная методика не обременительна для пациентов, проста в исполнении для медицинского персонала, но предусматривает использование специальной аппаратуры для анализа изотопных вариаций углерода на уровне природных концентраций [4].

**Цель** работы заключалась в модифицировании неинвазивного <sup>13</sup>C - УДТ в сравнении с зарубежными и изучении чувствительности, специфичности предложенного метода.

### Материалы и методы

Методы неинвазивной диагностики с использованием <sup>13</sup>C – мочевины предусматривают отбор проб выдыхаемого воздуха до приема <sup>13</sup>C - мочевины (регос) и через 30 минут после однократного приема 75-100 мг тестового препарата [5].

В России до 2003г. <sup>13</sup>C – мочевина не производилась, что сдерживало его разработку и внедрение в практическое здравоохранение. Модификация <sup>13</sup>C УДТ для снижения количества используемой импортной <sup>13</sup>C-мочевины без потери достоверности получаемых данных, проведена за счет использования в качестве пробного завтрака лимонной кислоты, с известным изотопным составом [6]. Прием лимонной кислоты давал ряд эффектов: "закисление" желудка, удлинение контакта изотопа с телом и дном желудка, активизация уреазной активности Hр, потенцирование поступления «эндогенной» мочевины в желудок за счет индукции цикла трикарбоновых кислот [6]. В результате отбора оптимального сорта лимонной кислоты (ЛК), предпочтение отдано ЛК с пониженным содержанием изотопа <sup>13</sup>C с заметно обедненной <sup>13</sup>C относительно базальной CO<sub>2</sub> [6]. Для проверки этого предположения проведено определение Hр указанными выше двумя методами одной и той же группы лиц (15 человек), страдавших язвенной болезнью.

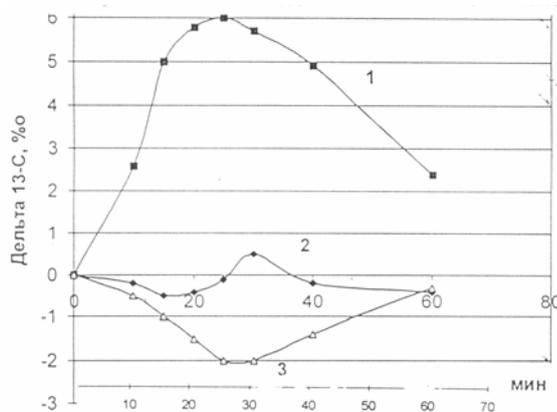
Всем пациентам проведено эндоскопическое исследование с прицельной биопсией слизистой оболочки желудка. Hр определялся по общепринятому методу

- окраской гистологических препаратов гематоксилином и эозином. Всем выполнен УДТ в двух вариантах: точечный с дозой 75 мг импортной мочевины и кинетический с 20 мг  $^{13}\text{C}$  – (импортной) мочевины с измерением содержания  $^{13}\text{CO}_2$  в порциях выдыхаемого воздуха с помощью масс-спектрометрии. Параллельно применяли ПЦР на ДНК *Hp* в биопсийном материале и кале пациента, бактериологический и *морфологический методы*.

При двухразовом анализе изотопного состава  $\text{CO}_2$  в выдыхаемом воздухе пациента одно измерение изотопного  $\text{CO}_2$  проводили до приема  $^{13}\text{C}$  – мочевины, второе - через 30 мин. после приема препарата. Пациент принимал натощак 150 мл апельсинового сока, а через 30 мин. - 75 мг  $^{13}\text{C}$  – мочевины. Второй вариант УДТ предусматривал многократную регистрацию изотопного состава  $\text{CO}_2$  после приема  $^{13}\text{C}$ -препарата по сравнению с содержанием  $^{13}\text{C}$ -изотопа в  $\text{CO}_2$  до приема  $^{13}\text{C}$ -мочевины. Пациент натощак принимал 20 мг  $^{13}\text{C}$  – мочевины и 2 грамма лимонной кислоты, растворенных в 150 мл кипяченной воды. Каждая порция выдыхаемого воздуха после приема раствора  $^{13}\text{C}$ -мочевины собиралась на 10-й, 15-й, 20-й, 25-й, 30-й, 40-й, 60-й минутах в отдельную стеклянную емкость объемом 50 мл, которая затем герметично закрывалась резиновой пробкой. Всего собиралось по 8 проб. На основании этих показателей устанавливалась кинетика выделения  $^{13}\text{C}$  углекислого газа в выдыхаемом воздухе.

Проверка сохранности газа в такой емкости показала возможность ее хранения до нескольких недель без потери информативности. Путем криогенной дистилляции в вакууме количественно отделяли метаболическую углекислоту от других газов и паров воздуха, затем вводили в масс-спектрометр (СН-7 Вариан, Германия). В обоих случаях количественные изменения содержания  $^{13}\text{C}$ -изотопа в  $\text{CO}_2$  ( $\delta$ ) определяли с помощью выражения  $\delta^{13}\text{C} = (R_t / R_0 - 1) \times 1000\%$ , где  $R_0/R_t$  отражало содержания  $^{13}\text{C}$  и  $^{12}\text{C}$  изотопов в  $\text{CO}_2$  до приема и после приема  $^{13}\text{C}$  – мочевины. Величина ошибки измерения разности в содержании  $^{13}\text{C}$  в анализируемой углекислоте относительно лабораторного стандарта не превышала 0,3 ‰. Обследовано 15 пациентов (12 мужчин и 3 женщины) в возрасте от 19 до 70 лет, страдавших язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки в стадии обострения в течение 3-40 лет. Диагноз подтвержден эндоскопическим исследованием, анамнестическими данными.

**Результаты и обсуждение:** после приема лимонной кислоты с  $^{13}\text{C}$ -мочевиной изо - топный состав  $\text{CO}_2$  имел пониженное содержание  $^{13}\text{C}$  при отсутствии *Hp* (рис. 1).



**Рис. 1.** Кинетика изотопного состава выдыхаемой углекислоты обследуемых пациентов в зависимости от времени наблюдения после приема через рот  $^{13}\text{C}$ -мочевины.

- 1 – кривая выхода  $^{13}\text{CO}_2$  с высокой степенью уреазной активности на 25 минуте;
- 2 – кривая со следовой реакцией выделения  $^{13}\text{CO}_2$  на 30 минуте;
- 3 – у обследуемого больного *Hp*-инфекция отсутствует

При наличии бактерий в желудочно-кишечном тракте отмечено сначала увеличение содержания  $^{13}\text{C}$  в выдыхаемой углекислоте, а затем его постепенное снижение до исходного уровня. Положение максимума выноса  $^{13}\text{CO}_2$  на временной шкале существенно различалось. Для большинства больных максимум выноса  $^{13}\text{CO}_2$  с выдыхаемым воздухом достигал через 15 минут, а у больных язвенной болезнью - в пределах 20-40 минут.

Результаты УДТ с различными дозировками мочевины (75мг и 20 мг на пробу) оказались сопоставимыми и положительными в 100 % случаев. Однако выявлены некоторые различия показателей УДТ и других методов исследования, сопровождающихся изучением биопсийного материала (табл. 1).

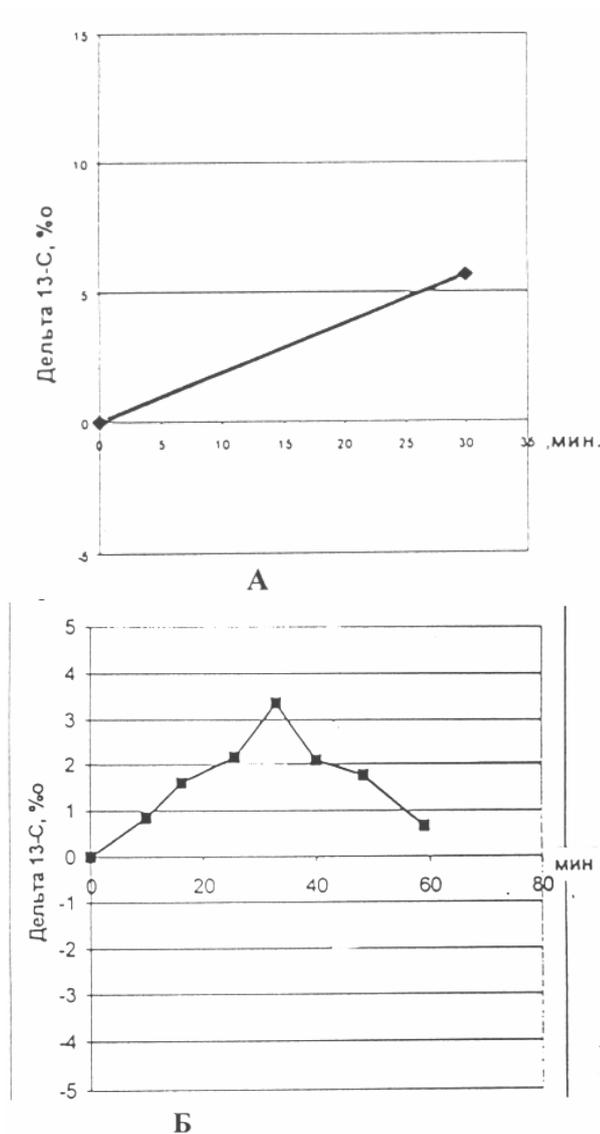
**Таблица 1.** Результаты определения Нр инфекции у пациентов с помощью инвазивных и неинвазивных методов (до эрадикационной терапии)

Больной Фам. Возраст	ПЦР на Нр в кале	ПЦР на Нр в би- оптате	Микро био- логи- ческий метод	УДТ 75 мг	УДТ + 20 мг лимон.к-та	Морфологич. метод (степень обсеменения Нр) x10 x 15
В. 23г	+	+	+	+	+	2-3
Б. 45л.	+	+	-	+	+	2-3
С. 38л.	+	+	+	+	+	3
Х. 22л	+	+	+	+	+	3
Ш. 24г	+	-	+	+	+	2-3
К. 70л	+	+	+	+	+	3
Д. 59л.	+	+	+	+	+	-
Х. 30л	+	+	-	+	+	3
Т. 68л	+	+	-	+	+	3
Р. 27л	+	+	-	+	+	3
С. 20	+	+	+	+	+	3
К. 20г.	-	-	-	+	+	3
М. 19л	+	+	+	+	+	1
З. 21г.	-	-	-	+	+	1
Ж. 41г.	+	-	-	+	+	1

” + “ положительный ответ, “ - ” отрицательный ответ.

Различия между показателями  $^{13}\text{C}$ -УДТ и результатами микробиологического метода, а также ПЦР на ДНК Нр в биоптате объяснены ограниченным количеством биопсийных кусочков с разной обсемененностью слизистой оболочки Нр, а также артефактами в сохранении активных культур в анаэробной среде при доставке ее в микробиологическую лабораторию. Полученные результаты микробиологического метода коррелируют с частотой выделения чистой культуры Нр по данным мировой литературы, которая колеблется от 33 до 97%. Этот фрагмент работы позволил в последующем использовать тестовый препарат для УДТ на Нр в количестве 20мг и обследовать в 3 раза больше пациентов, чем ранее предложенным способом. Для точечного УДТ пороговым показателем считается 5‰  $^{13}\text{CO}_2$   $\delta$ , а для кинетического УДТ этот

показатель составил  $> 2 ‰$ , т. е, в два раза выше ( рис. 2 ). На основании проведенных исследований установлено, что разработанная методика  $^{13}\text{C}$  УДТ с использованием 20 мг  $^{13}\text{C}$  мочевины и лимонной кислоты с определенным изотопным составом, показала аналогичные результаты с исходным  $^{13}\text{C}$  УДТ, в котором использовалась нагрузка в 75мг. Нам удалось добиться снижения тестовых доз  $^{13}\text{C}$ -мочевины без снижения информативности и чувствительности метода за счет индукции цикла трикарбоновых кислот лимонной кислотой \*.



**Рис. 2.** График изотопных вариаций  $^{13}\text{C}$  в выдыхаемой углекислоте  
 А - точечный  $^{13}\text{C}$ -УДТ с пороговым показателем 5‰  
 Б - кинетический  $^{13}\text{C}$ -УДТ с пороговым показателем 2‰

### Заключение

УДТ является интегральным показателем уреазной активности, легко воспроизводим для медицинского персонала, при этом достоверность результатов УДТ сопоставима с результатами современных методов выявления *Hp* (морфологический, ПЦР, бактерио-логический). Микробиологический метод диагностики *Hp* требует особо тщательного соблюдения условий хранения, транспортировки и последующего посева на селективные среды. Основная причина негативных результатов заключается в особенностях соблюдения микроаэрофильных условий при подготовке материала к его транспортировке. В

отделении гастроэнтерологии МОНИКИ совместно с ИБМФ им. Г.К. Скрыбина РАН разработана модификация УДТ с использованием 20мг  $^{13}\text{C}$  - (импортной) мочевины вместо традиционно используемых 75-100мг\*.

1. Аруин Л.И., Капуллер Л.Л. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника.-Триада X,-Москва, 1998,-483с.
2. Щербаков П.Л. Эпидемиология инфекции *Helicobacter pylori*// ИвашкинВ.Т.,Мегро Ф., ЛапинаТ. Л., ред. *Helicobacter pylori*:революция в гастроэнтерологии//Москва:Триада-X;-1999-С.14-20.
3. ИсаковВ.А., ДомарацкийИ.В.Хеликобактериоз//Медпрактика-Москва-2003.- С.229-235.
4. Barthel J.S.,Everett E.D. Diagnosis of *Campylobacter pylori* infection: the "gold standard" and the alternatives.- *Rev.Inf.Dis.*, -1990-v.12. -s.l. -p. S107-S114.
5. Graham D.Y.,Klein P.D.,Evans D.J.et al.*Campylobacter pylori* detected non-invasively by the  $^{13}\text{C}$ -ureabreath test.//*Lancet.*-1987.-ii:P.1174-1177
6. Logan R.P.H., Polson R.J., et al. A simplified single  $^{13}\text{C}$  urea breath test for *Helicobacter pylori*; comparisos with histology, culture and ELISA serology.\\*Gut.*-1991.-Vol.32.-P.1461-1464.

\* на представленный «Способ неинвазивной диагностики хеликобактерной инфекции» (Зякун А.М., Цодиков Г.В., Сакович Л.В.) получен патент на изобретение 27 мая 2004. Заявка N2001133784/14(036532) от 18.12.2001.

#### DEVELOPMENT OF THE MODIFIED UNINVASIVE METHOD OF DIAGNOSTICS HELICOBACTER PYLORI.

MONIKI named after M.F.Vladimirsky,  
email: [tsodikmoni07@rambler.ru](mailto:tsodikmoni07@rambler.ru)

Technology of modified breath ureasa test with  $^{13}\text{C}$ -urea and demonstration its diagnostic precisions.  
Based on the addition citric acid with low level of  $^{13}\text{C}$ -isotop.