

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Р.А.Часнойть

« 9 » ноября 200 7 г.

Регистрационный номер 28-0306



СПОСОБ ВЫЯВЛЕНИЯ HELICOBACTER PYLORI В РОТОВОЙ ПОЛОСТИ С ПОМОЩЬЮ ТЕСТ-ЗОНДА

инструкция по применению

(Патент Республики Беларусь на изобретение № 7440
Патент Республики Беларусь на полезную модель № 731
Патент Республики Беларусь на полезную модель № 1354)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:

Учреждение образования «Гомельский государственный медицинский университет»

АВТОРЫ:

к.м.н., доцент, заведующий кафедрой патологической физиологии Учреждения образования «Гомельский государственный медицинский университет» Т.С.Угольник;

к.б.н., доцент Н.Н.Острейко;

к.м.н., доцент кафедры ортопедии, травматологии и ВПХ с курсом ЛОР-болезней и стоматологии Н.М.Гризна

Показания к применению:

Выявление уреазной активности *Helicobacter pylori* в ротовой полости (зубном налете, зубодесневых карманах):

- у здоровых лиц;
- у больных с патологическими процессами в тканях периодонта.

Перечень необходимого медицинского оборудования, медицинских препаратов, инструментария:

- Тест-зонд для диагностики *Helicobacter pylori* в ротовой полости;
- Модифицированный тест-зонд для диагностики *Helicobacter pylori* в содержимом зубодесневых карманов ротовой полости.

Список сокращений:

Нр — *Helicobacter pylori*

ЗН — зубной налет

ЗДК — зубодесневые карманы

ПЦР — полимеразная цепная реакция

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗУЕМОГО МЕТОДА

Учитывая широкий круг заболеваний, ассоциированных с *Helicobacter pylori*, а также персистенцию данного микроорганизма в полости рта, важное значение имеет выявление Нр в ротовой полости.

Нами разработан тест-зонд, с помощью которого можно выявлять Нр в ротовой полости по уреазной активности. Он представляет собой деревянное долотце с односторонней заточкой, состоящее из ручки длиной 50–100 мм и рабочей части в форме плоской лопаточки шириной 2–5 мм (рисунок 1). Рабочая часть тест-зонда окрашена в желтый цвет за счет пропитки 50%-ным раствором мочевины и 0,1–0,5%-ным раствором индикатора рН фенолового красного.



Рисунок 1 — Тест-зонд для выявления *Helicobacter pylori* в ротовой полости

В основе способа лежит способность микроорганизма *Helicobacter pylori* продуцировать в высоких концентрациях фермент уреазу, который ферментирует водный раствор мочевины с образованием аммиака и углекислого газа. Щелочные продукты реакции вызывают локальное увеличение рН среды с изменением цвета индикатора. Уровень продукции уреазы *Нр* чрезвычайно высок, а удельная уреазная активность *Helicobacter pylori*, оцениваемая по выходу аммиака, в 2,5 раза превышает уреазную активность других уреазопродуцентов.

Если *Нр* присутствует в исследуемом образце (ЗН, ЗДК), то в результате гидролиза мочевины под действием фермента уреазы *Нр* повышается рН среды, что сопровождается изменением цвета рабочей части тест-зонда с желтого на малиновый. Скорость изменения и интенсивность цвета рабочей части тест-зонда свидетельствуют о степени инфицированности *Нр*.

Методика проведения исследования

1. Достать тест-зонд из упаковки, держа его за ручку (неокрашенную часть).
2. Смочить рабочую (окрашенную) часть тест-зонда водой или слюной.
3. Заточенной (вогнутой) стороной рабочей части тест-зонда осторожно забрать исследуемый материал — зубной налет, содержимое зубодесневых карманов (рисунок 2).

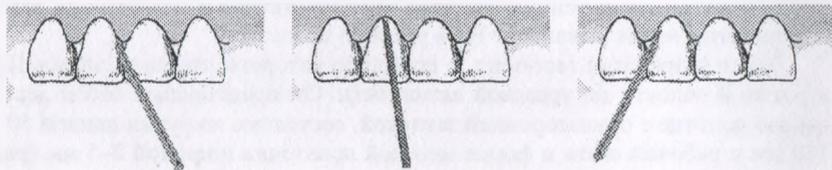


Рисунок 2 — Этапы забора исследуемого материала

4. Положить тест-зонд заточенной стороной вверх. Изменение цвета рабочей части тест-зонда с желтого на малиновый в течение 5 минут от момента забора свидетельствует о наличии уреазы *Helicobacter pylori* в исследуемом материале — результат считается положительным (рисунок 3).



Рисунок 3 — Изменение цвета рабочей части тест-зонда при положительном результате

5. Отсутствие изменения цвета рабочей части тест-зонда после указанного времени следует расценивать как отрицательный результат.

Примечание. Для исключения ложноположительных и ложноотрицательных результатов рекомендуется осуществлять забор исследуемого материала натощак, при этом не чистить зубы, не красить губы, не принимать в течение 3 недель до исследования лекарственных средств (антибиотики, соли висмута), которые угнетают жизнедеятельность *Helicobacter pylori*.

Избегать ложноположительных результатов при случайном попадании крови на рабочую часть тест-зонда и повысить чувствительность предлагаемого метода определения уреазной активности Hp можно используя модифицированный тест-зонд. Индикатором в модифицированном тест-зонде является 0,5%-ный раствор бромтимолового синего. При наличии *Helicobacter pylori* в биологическом материале цвет рабочей части модифицированного тест-зонда изменяется с желтого на синий. За счет снижения точки перехода индикатора у фенолового красного с pH 7,4 до 6,8 у бромтимолового синего, срок проведения исследования сокращается с 5 до 3 минут.

Возможные ошибки и осложнения:

- отсутствие смачивания рабочей части зонда;
- забор исследуемого материала с помощью нерабочей части тест-зонда;
- интерпретация результатов исследования после указанного времени;
- нарушение цветового зрения при оценке изменения окраски рабочей части тест-зонда путем самоанализа.

Противопоказания:

- повышенная чувствительность к феноловому красному, бромтимоловому синему и мочеvine;
- травматические повреждения зубочелюстного аппарата;
- гемофилия.

Предлагаемая методика выявления уреазной активности *Helicobacter pylori* в ротовой полости с помощью тест-зонда имеет ряд преимуществ, т.к. тест-зонд сочетает в себе одновременно устройство для забора исследуемого материала и диагностикум для индикации уреазы *Helicobacter pylori*. Тест-зонд используется однократно.

Способ выявления *Helicobacter pylori* в ротовой полости прост в применении, не требует дорогостоящих реактивов, дополнительного медицинского инструментария, оборудования, а также привлечения квалифицированного медицинского персонала к исследованию, позволяет проводить скрининговые обследования многочисленных коллективов, может быть использован для самоанализа.

Обоснование целесообразности практического использования способа выявления *Helicobacter pylori* в ротовой полости с помощью тест-зонда

Инфекция *Helicobacter pylori* является причиной многих Нр-ассоциированных заболеваний. Первичным местом контакта Нр с организмом человека является ротовая полость, которая в ряде случаев может являться источником геликобактерной инфекции, а также реинфекции после эрадикации Нр. В связи с вышеизложенным, важное значение в проблеме геликобактериоза приобретают вопросы, связанные с диагностикой Нр в ротовой полости.

Существует множество различных методов выявления Нр, применение которых диктуется различными целями: первичная диагностика Нр или контроль за эрадикацией геликобактерной инфекции после проведенного лечения. Они имеют различные характеристики эффективности (чувствительность, специфичность, диагностическая точность), различную стоимость, степень сложности исполнения. Использование высоких технологий (ПЦР-анализ) для динамического наблюдения за характером носительства Нр в ротовой полости, а также с целью формирования групп риска и проведения индивидуальных профилактических мероприятий не всегда целесообразно, так как они предназначены, в большей мере, для постановки диагноза и контроля за эрадикацией Нр после специфического лечения и не могут быть применены многократно в течение длительного времени.

В настоящее время имеется большое количество тестов для ускоренной диагностики Нр. В частности, для экспресс-диагностики Нр широко исследуются тест-методы, представляющие рутинные приемы биологического, химического, биохимического тестирования и индикации с использованием простейших средств и методов. Автоматизированные системы диагностики Нр непригодны для массового использования из-за дороговизны и трудоемкости.

С целью упрощения диагностики геликобактерной инфекции в Гомельском государственном медицинском университете разработан способ выявления уреазной активности *Helicobacter pylori* в содержимом зубодесневых карманов ротовой полости с помощью тест-зонда. Предлагаемый способ апробирован в Гомельской областной клинической поликлинике.

Учитывая неоднозначные мнения о диагностических характеристиках уреазных тестов, нами было проведено определение уреазы Нр в содержимом ЗДК ротовой полости у 55 человек с помощью разработанного тест-зонда и сравнение полученных данных с результатами идентификации Нр в ротовой полости методом полимеразной цепной реакции (ПЦР). ПЦР-диагностику проводили одновременно с обследованием с помощью тест-зонда. В качестве стандартного теста использовали выявление видоспецифичной ДНК Нр методом ПЦР с определением фрагмента гена *ureC* на наборе *Helicopol II*, НПФ «Литех», г. Москва.

При оценке эффективности тест-зонда для выявления Нр в содержимом ЗДК учитывали следующие характеристики тест-системы:

- чувствительность [sensitivity: $Se = ИП / (ИП + ЛО)$];
- специфичность [specificity: $Sp = ИО / (ИО + ЛП)$];
- распространенность (prevalence: $P = (ИП + ЛО) / (ИП + ЛО + ИО + ЛП)$);
- точность теста [test accuracy: $TA = (ИП + ИО) / (ИП + ЛО + ИО + ЛП)$];
- прогностическая ценность отрицательного результата теста [negative predictive value: $-PV = ИО / (ЛО + ИО)$];
- прогностическая ценность положительного результата [positive predictive value: $+PV = ИП / (ИП + ЛП)$];
- отношение правдоподобия положительного результата теста [positive likelihood ratio: $LR+ = (ИП / (ИП + ЛО)) / (ЛП / (ЛП + ИО))$];
- отношение правдоподобия отрицательного результата теста [negative likelihood ratio: $LR- = (ЛО / (ИП + ЛО)) / (ИО / (ИО + ЛП))$];

где ТЗ — тест-зонд, ИП — число истинно положительных результатов ТЗ, ЛО — число ложноотрицательных результатов ТЗ, ИО — число истинно отрицательных результатов ТЗ, ЛП — число ложноположительных результатов ТЗ.

В результате проведенных исследований установлено наличие статистически значимой прямой корреляционной взаимосвязи между результатами ПЦР с содержимым ЗДК ротовой полости и результатами, полученными с помощью тест-зонда ($p < 0,01$). Полное совпадение результатов полимеразной цепной реакции и тест-зонда наблюдалось у 41 (75,9%) человека. Результаты оценки эффективности тест-зонда для выявления Нр в содержимом ЗДК представлены в таблице 1.

Таблица 1 — Оценка эффективности тест-зонда для выявления Нр в содержимом ЗДК ротовой полости

Показатели	Результат
Чувствительность (Se)	0,94
Специфичность (Sp)	0,65
Распространенность (P)	0,33
Точность теста (TA)	0,75
Прогностическая ценность при отрицательном результате (-PV)	0,96
Прогностическая ценность при положительном результате (+PV)	0,57
Отношение правдоподобия положительного результата (LR+)	2,69
Отношение правдоподобия отрицательного результата (LR-)	0,09

Диагностические характеристики разработанного тест-зонда являются достаточно высокими для неинвазивных методов выявления Нр, особенно, в ротовой полости. По сравнению с другими методами, используемыми в настоящее время для диагностики геликобактерной инфекции в ротовой полости (молекулярно-генетический — ПЦР, бактериологический, имму-

ноферментный и др.), предлагаемый способ выявления *Helicobacter pylori* в ротовой полости с помощью тест-зонда имеет ряд преимуществ:

1. Тест-зонд для выявления *Helicobacter pylori* в ротовой полости сочетает в себе одновременно устройство для забора исследуемого материала и диагностикум для индикации уреазы Нр, что значительно упрощает процедуру исследования и экономически выгодно.

2. Тест-зонд используется однократно, не требует дорогостоящих реактивов, дополнительного медицинского инструментария и оборудования, привлечения квалифицированного медицинского персонала к проведению исследования и интерпретации результатов.

3. Предлагаемый способ представляет собой экспресс-анализ уреазной активности Нр в ротовой полости, что позволяет использовать его для скрининговой диагностики геликобактерной инфекции.

4. Способ выявления *Helicobacter pylori* в ротовой полости с помощью тест-зонда прост в применении, что позволяет применять его для самоанализа.

5. Предлагаемый способ выявления уреазной активности Нр неинвазивен, что дает возможность его использования в разных группах населения, у которых применение других методов первичной диагностики геликобактерной инфекции затруднительно.

ЛИТЕРАТУРА

1. Оро-оральный путь распространения *Helicobacter pylori*: выделение бактерий из зубных бляшек у супругов, родителей и их детей / В. В. Зоркин [и др.] // Рос. журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. — 1997. — Т. 7, № 5, прил. № 4. — С. 27–28.
2. Крендаль, П. Е. Медицинское товароведение / П. Е. Крендаль, Ю. Ф. Кабатов. — М.: Медицина, 1974. — С. 305.
3. О возможности пребывания *Helicobacter pylori* в покоящемся состоянии в слизистой оболочке желудка у больных язвенной болезнью после лечения / А. С. Логинов [и др.] // Терапевтический архив. — 1999. — № 2. — С. 13–16.
4. Применение полимеразной цепной реакции для идентификации *Helicobacter pylori* в клиническом материале / Г. А. Маркова [и др.] // Молекулярная генетика, микробиология, вирусология. — 1994. — № 1. — С. 10–15.
5. Определение *Helicobacter pylori* в ротовой полости и слизистой оболочке желудка до и после эрадикационной терапии / М. Г. Софхер [и др.] // Рос. журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. — 1997. — № 5. — С. 51–52.
6. Цимбалистов, А. В. Инфицированность полости рта *Helicobacter pylori* как прогностический фактор течения язвенной болезни / А. В. Цимбалистов, А. Ю. Барановский, Н. С. Робакидзе // Новое в стоматологии. — 2001. — № 4. — С. 74.
7. Уразова, Р. З. Новые принципы лечения воспалительных заболеваний слизистой полости рта и тканей пародонта у детей с гастродуоденальной патологией / Р. З. Уразова // Новое в стоматологии. — 2001. — № 9. — С. 21–25.
8. Axon, A.T.R. Is *Helicobacter pylori* transmitted by the gastro-oral route / A.T.R. Axon // J. Antimicrob. Chemother. — 1996. — № 9. — P. 585–588.
9. *Helicobacter pylori* in dental plaque / N. Banatvala [et al.] // Lancet. — 1993. — Vol. 341. — P. 380.
10. Dental plaque: A permanent reservoir of *Helicobacter pylori*? / H. G. Desai [et al.] // Scand. J. Gastroenterol. — 1991. — Vol. 26. — P. 1205–1208.
11. Presence of *Helicobacter pylori* in the oral cavity, oesophagus, stomach and faeces of patients with gastritis / F. Namavar [et al.] // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. — 1995. — Vol. 14, № 3. — P. 234–237.
12. Riggio, M. P. Identification by PCR of *Helicobacter pylori* in subgingival plaque of adult periodontitis patients / M. P. Riggio, A. Lennon // J. Med. Microbiol. — 1999. — Vol. 48, № 3. — P. 317–322.