

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
БЕЛАРУСЬ

ГОМЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ ИНСТИТУТ

Т.С. Угольник, С.А. Шут

**ПРИНЦИПЫ ДИАГНОСТИКИ
ГЕЛИКОБАКТЕРНОЙ ИНФЕКЦИИ**

Учебное пособие

Утверждено Научно-методическим советом института
в качестве учебного пособия 01.06.2000 г., протокол № 27

Гомель 2000

УДК 616.98-07
ББК54.132+55.14

Рецензент: зав. кафедрой инфекционных болезней ГоГМИ, кандидат мед. наук, доцент Красавцев Е.Л.

Угольник Т.С., Шут С.А.

Принципы диагностики геликобактерной инфекции: Учебное пособие/
Т.С.Угольник, С.А.Шут. – Гомель: ГоГМИ, 2000. – 31с.

ISBN

Отражены основные свойства *Helicobacter pylori*, а также методы диагностики геликобактерной инфекции. Представлен сравнительный анализ основных методик, использующихся в настоящее время для выявления геликобактериоза.

Учебное пособие предназначено для студентов 3 - 6 курсов лечебно-профилактического факультета медицинского института.

УДК 616.98-07

ББК54.132+55.14

ISBN

© Коллектив авторов, 2000

© Гомельский государственный
медицинский институт, 2000

Ранее считалось, что желудок человека практически стерилен, поскольку его кислая среда препятствует жизнедеятельности большинства бактерий. Однако в определенных условиях слизистую оболочку желудка колонизируют немногочисленные виды микробов. В 1939 г J. Doengas, исследуя желудки жертв несчастных случаев, выделил из слизистой оболочки желудка бактерию спиралевидной формы, а в начале 80-х годов XX столетия произошло событие, которое коренным образом изменило наше представление о патогенезе целого ряда заболеваний верхнего отдела желудочно-кишечного тракта. В 1984 году австралийские исследователи J. Warren и B. Marshall опубликовали в журнале "Ланцет" данные об успешном культивировании новой бактерии, выделенной из биоптатов больных с пептической язвой и гастритом, которая впоследствии была названа *Helicobacter pylori*.

Helicobacter pylori (HP) является s-образной палочкой длиной от 2 до 6,5 мкм и шириной от 0,5 до 0,6 мкм, имеющей от 2 до 4 жгутиков, способствующих перемещению бактерии в толще желудочной слизи. Оптимальные условия для роста и размножения HP: температура 37-42°C, pH = 4-6, но бактерии выживают также и в среде с pH = 2. В процессе жизнедеятельности HP вырабатывает большое количество различных ферментов: уреазы, оксидазы, каталазы, щелочная фосфатаза, гамма-глутамилтрансфераза.

Отличительной особенностью, усложняющей диагностику геликобактериоза, является диморфизм HP, то есть способность трансформироваться в кокковые формы. Существует 2 типа трансформации: 1-й тип возникает при старении культуры, 2-й тип – при изменении условий обитания (изменение температуры и pH

среды, ее осмолярности) и назначении антибактериальных средств. Кокковидные формы НР 2-го типа теряют свою ферментативную активность и репродуктивную способность, у них редуцируется обмен веществ, что создает благоприятные условия для их сохранения в кишечнике и во внешней среде, откуда они могут передаваться людям фекально-оральным путем. Попад в желудок, они, в благоприятных для них условиях, могут трансформироваться в спиралевидные вегетативные формы НР и вновь колонизировать слизистую оболочку желудка.

НР обладает тропностью к желудочному эпителию. Из-за выраженной чувствительности к кислой среде, бактерии обитают в подслизистом слое желудка, а также в двенадцатиперстной кишке, но спорадически могут существовать в других отделах пищеварительного тракта, в основном на участках желудочной метаплазии. Другой механизм защиты - наличие энзима уреазы, позволяющей НР ферментировать мочевины в аммиак и бикарбонат. При этом вокруг микроорганизма образуется щелочная среда, создающая благоприятные условия для обитания в желудке.

Попадая в просвет желудка, НР проникает в слой защитной слизи и затем адгезируется на покровно-ямочном эпителии антрального отдела желудка. Электронная микроскопия позволила выявить три возможных способа контакта НР с эпителием:

- наличие в толще слизи и контактирование с короткими, неравномерно расположенными неповрежденными микроворсинками эпителиальных клеток;
- наличие не только между ворсинками, но и в межклеточном

пространстве;

- прикрепление большого количества микроорганизмов с помощью нитевидных отростков к определенным участкам эпителиальных клеток с малым количеством ворсинок, гранул мукоида и без наличия защитного слоя слизи.

Предполагают, что указанные способы могут быть стадиями развития патологического процесса. Наиболее прочно НР связываются с экстрактами липидов их антрального отдела желудка. НР реагируют с сульфированным алкилацилглицеролипидом. Предполагают, что этот субстрат является специфическим рецептором для НР.

Патогенность НР определяется рядом факторов:

1. Цитотоксин, белок с молекулярной массой более 100 кД, чувствительный к действию трипсина и осаждающийся в присутствии сульфата аммония. Инактивируется нагреванием при 70°C в течение 1 часа.
2. Ферменты:
 - уреазы - вступает во взаимодействие с мочевиной, находящейся в содержимом желудка и вызывает ее разложение до углекислого газа и аммиака, который резко ощелачивает среду, меняя рН желудочного содержимого в щелочную сторону;
 - протеолитические ферменты, разрушающие муцин эпителиального слоя слизистой оболочки желудка;
 - липолитические ферменты, разрушающие липиды и фосфолипиды гастрального эпителия;
 - фермент ДНКазы, способный нарушить синтез белка. Специфические гемагглютинины, которые "распознают" сиаловые кислоты

слизистой оболочки и являются фактором, облегчающим колонизацию желудка бактериями НР.

3. Связывание с эпителием сопровождается развитием местной воспалительной и системной иммунной реакцией, ведет к дегенерации слоя защитной слизи с разрушением ткани.

Существует несколько механизмов, с помощью которых НР может индуцировать воспалительный процесс:

- способность бактерий внедряться в слизистую оболочку желудка, избегая уничтожения;
- цитотоксическое действие за счет своих ферментов и медиаторов воспаления;
- возможность стимулировать образование антител, которые вступают в перекрестную реакцию с человеческими антигенами антрального отдела желудка;
- гипергастринемия и воздействие соляной кислоты на незащищенную муциновым слоем слизистую оболочку как результат действия ферментов микроба.

Рис. 1. Патогенные свойства *Helicobacter pylori* по А.Р. Moran, 1996.



При развитии патологического процесса в слизистой оболочке, агрессивные свойства кислоты и пепсина могут вызвать развитие язвенного поражения. Поступление кислого содержимого желудка в луковицу двенадцатиперстной кишки приводит к развитию в ней участков желудочной метаплазии слизистой. Это, в свою очередь, обуславливает инфицирование участков метаплазированного эпителия в двенадцатиперстной кишке и развитие язвенного дефекта.

Таким образом, есть все основания утверждать, что НР играет ведущую роль в развитии язвы желудка и двенадцатиперстной кишки. НР также классифицирован ВОЗ как облигатный карциноген и "играет причинную роль в цепи событий, ведущих к раку желудка". Потенциальное значение НР для злокачественных опухолей желудка: карциномы и МАLТомы (mucosa-associated lymphoid tissue - лимфома, происходящая из лимфоидной ткани, ассоциированной со слизистой

оболочкой) доказано на основании следующих тезисов:

1. НР обнаруживается у подавляющего большинства больных со злокачественными опухолями желудка;
2. распространение НР в популяции коррелирует с частотой злокачественных новообразований желудка;
3. лица, инфицированные НР, относятся к группе высокого риска развития рака желудка;
4. НР предшествует развитию опухоли;
5. эрадикация НР может привести к излечению В-клеточной лимфомы желудка низкой степени злокачественности (М. Дельтерне и др.1999г).

Распространенность НР широко варьирует внутри и между популяциями. Частота увеличивается с возрастом и обратно пропорциональна социально-экономическому статусу.

Сведения по изучению геликобактериоза из Австралии, Великобритании, Бельгии, Нидерландов, ФРГ, Дании, Италии, Израиля, Индии, Ирландии, Малайзии, Перу, Польши, России, Саудовской Аравии, США, Тайваня, Украины, Финляндии, Франции, Швеции, Шотландии, Эстонии и Японии свидетельствуют о повсеместной распространенности геликобактериоза. Наименьшая пораженность НР отмечена в Малайзии, где среди здоровых лиц антитела к НР выявлены только у 4,6%. В Швеции антитела к НР обнаружены у 48,0% здоровых людей, а в Японии - у 74,7% обследованных.

Выявлению факторов риска возникновения Нр-инфекции было посвящено несколько исследований. Влияние расы, возраста, пола и образа жизни на наличие НР-инфекции исследовал д-р

Replogl (Стенфордский Университет, Калифорния), который провел скрининговое исследование для выявления НР. Им названы следующие факторы риска: черная раса, испанская национальность, старение, мужской пол и рождение в развивающейся стране. Д-р Correa (LSU Medical Center) добавляет также курение.

Резервуаром НР является инфицированный ею человек. Пути распространения бактерий до конца не изучены, предполагаются oro-оральный и фекально-оральный пути передачи инфекции.

ПРИНЦИПЫ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИИ HELICOBACTER PYLORI

Инфекция *Helicobacter pylori* является наиболее распространенной в мире, с ней связывают развитие и рецидивирование язвы двенадцатиперстной кишки в 99,9% случаев и хронического гастрита в 75-85% случаев. Российская группа по изучению геликобактериоза разработала "Рекомендации по диагностике и лечению инфекции НР у взрослых при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки". Они прошли обсуждение на научной конференции, посвященной 100-летию со дня рождения В.Х. Василенко в апреле 1997 г. и на III Национальной гастроэнтерологической неделе в ноябре 1997 г. Рекомендации достаточно кратки, конкретны и призваны помочь практикующим врачам и организаторам здравоохранения.

Для диагностики НР предложено множество различных методов, и с каждым годом появляются все новые, а существующие

часто модернизируются.

Методику диагностики НР удобно разделить на 2 группы:

1. До лечения: первичная диагностика - обнаружение инфекции для обоснования назначения лечения;
2. После проведения эрадикационной терапии - диагностика эрадикации, то есть контроль успешности антибактериальной схемы ("эрадикация" - это полное уничтожение бактерии НР (как вегетативной, так и кокковидной формы) в желудке и двенадцатиперстной кишке человека).

Первичная диагностика инфекции, вызванной *Helicobacter pylori*, должна осуществляться методами, непосредственно выявляющими бактерию или продукты ее жизнедеятельности в организме больного. Данным требованиям удовлетворяют следующие способы:

1. Бактериологический - посев биоптата слизистой оболочки желудка на дифференциально-диагностическую среду.
2. Морфологический - окраска бактерии в гистологических препаратах слизистой оболочки желудка по Гимзе, толуидиновым синим, Вартину-Старри и Генте; цитологический - окраска бактерии в мазках-отпечатках биоптатов слизистой оболочки желудка по Гимзе и Граму.
3. Дыхательный - определение в выдыхаемом больным воздухе изотопов ^{13}C или ^{14}C , выделяющихся в результате расщепления в желудке больного меченой мочевины под действием уреазы *Helicobacter pylori*.
4. Уреазный - определение уреазной активности в биоптате

слизистой оболочки желудка путем помещения его в жидкую или гелеобразную среду, содержащую субстрат, буфер и индикатор.

Для первичной диагностики НР достаточно положительного результата одного из вышеназванных методов. Первичную диагностику необходимо проводить пациентам, которым планируется антигеликобактерная терапия.

Более сложным является определение эффективности антигеликобактерной терапии. При этом возможно получение ложноотрицательных результатов.

Диагностика эрадикации должна базироваться на следующих принципах:

1. Диагностика эрадикации осуществляется не ранее 4-6 нед. после окончания курса антигеликобактерной терапии либо после завершения лечения любыми антибиотиками или антисекреторными средствами сопутствующих болезней.
2. Диагностика эрадикации осуществляется, как минимум, двумя из указанных диагностических методов. При использовании методов непосредственного обнаружения в биоптате слизистой оболочки желудка (бактериологический, морфологический, уреазный) необходимо исследование 2 биоптатов из тела желудка и 1 биоптата из антрального отдела.

Для проведения скрининговых исследований чаще всего используются методы, основанные на обнаружении специфических антигеликобактерных антител классов А и G в сыворотке, плазме или капиллярной крови обследуемых лиц. Наиболее изученными являются следующие серологические методы:

1. Иммуноферментный анализ;

2. Экспресс-тесты на основе иммунопреципитации или иммуноцитохимии с использованием в качестве пробы капиллярной крови больных и цветовым усилением продуктов реакции. Они могут быть использованы для удешевления первичной диагностики инфекции, т.к. положительный результат теста в ясной клинической ситуации позволяет исключить дорогостоящее эндоскопическое обследование, а также использование методов непосредственной диагностики. Нельзя использовать экспресс-тесты для определения эрадикации после лечения.

Основные группы методов, разработанные для диагностики инфекции НР, можно группировать, используя несколько подходов к их классификации (таблица 1).

Таблица 1.

Основные группы методов диагностики *H. pylori* по Т.Л. Лапиной, 1999г.

А - ИНВАЗИВНЫЕ	Б - НЕИНВАЗИВНЫЕ
а) – ПРЯМЫЕ	б) - КОСВЕННЫЕ
<ul style="list-style-type: none"> ◆ I - бактериологический ◆ II - гистологические ◆ III - основанные на уреазной активности НР: уреазные тесты с биоптатами желудка; дыхательные тесты с мочевиной, меченной ¹³C/¹⁴C ◆ IV - иммунологические: серологические; иммуногистохимические ◆ V - молекулярные - полимеразная цепная реакция 	

К инвазивным относят методы, для проведения которых необходима эзофагогастродуоденоскопия, так как материалом для исследования служат биоптаты слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки.

Неинвазивными названы методы, не требующие эндоскопического исследования, при этом материалом для идентификации бактерий служат кровь, сыворотка, желудочный сок, слюна, моча, кал и др.

Прямые методы позволяют непосредственно выявить микроорганизм.

При косвенных методах исследования регистрируется не сама бактерия, а продукты ее жизнедеятельности в организме.

Рассмотрим группы методов выявления НР.

Бактериологический метод дает возможность культивировать НР, используя биоптаты слизистой оболочки желудка. Специфичность этого метода - 100%.

При получении чистой культуры НР можно изучить его факторы патогенности, создать банк штаммов для эпидемиологических и других исследований. Полученные штаммы микроорганизма можно проверить на устойчивость к антибактериальным препаратам. Чувствительность бактериологического метода во многом зависит от оснащенности микробиологической лаборатории и квалификация ее персонала.

Этот вид микроорганизма неустойчив во внешней среде и нуждается в специальных условиях для культивирования.

Взятие материала не всегда возможно в условиях лаборатории,

поэтому, для продления срока транспортировки биоптатов, разработаны специальные транспортные среды: Стюарта, Кэри-Блера, Био Мерью.

Транспортная среда Стюарта:

Глицерофосфат натрия - 10,0г; Тиогликолат натрия - 0,5г; Цистеина гидрохлорид - 0,5г; Хлорид кальция - 0,1г; Метиленовый синий - 0,001г; Агар - 5,0г; Вода дистиллированная - 1л.

Приготовление: довести до кипения, чтобы все компоненты полностью растворились. Разлить по небольшим герметично закрывающимся сосудам (емкостью 5-7мл) так, чтобы они были заполнены доверху. Герметично закрыть флаконы, автоклавировать при 121°C.

После доставки материала в лабораторию производится посев биоптата на неселективные и селективные среды.

Неселективные среды: шоколадный агар, содержащий 1% isovalex, и агар "Колумбия", содержащий 10% крови барана.

Селективные среды: агар "Колумбия", содержащий 10% крови барана, селективную добавку из антибиотиков, 0,01% гемина, 0,04% трифенилтетразолиума хлорида (ТТС); агар Вилькинса - Шальгрена (10% крови барана и селективная добавка из антибиотиков).

Селективные добавки из антибиотиков:

- DENT (Oxoid SR 147):

Ванкомицин - 10мг/л; Триметоприм - 5мг/л; Цефсулодин - 5 мг/л Амфотерицин - 5 мг/л

- Skirrow (Oxoid SR 69):

Ванкомицин - 10мг/л; Триметоприм - 5 мг/л; Полимиксин В - 2500 ME

Посевы инкубируются при температуре 37°C, влажности 98%, в микроаэрофильных условиях в течение 3-10 суток. НР растет в атмосфере азота, содержащей 5% кислорода, 5-10% углекислого газа. Для создания микроаэрофильной атмосферы используют газорегенераторные пакеты, которые продуцируют газовые смеси после добавления в них воды. Рост культуры НР происходит, как правило, на 3-и сутки. При появлении колоний, сходных по морфологии с НР (диаметром до 0,5-2 мм в виде "капель росы" или при сплошном росте, образующие прозрачную пленку), проводится их идентификация.

Для идентификации мазки окрашивают по Граму. Под микроскопом в случае наличия НР обнаруживают грамотрицательные изогнутые палочки. Проводят биохимическое типирование - уреазная, каталазная, оксидазная активность, НР не ферментирует глюкозу, не продуцирует нитраты, не образует индол.

Предложена методика полуколичественного определения обсеменения слизистой оболочки желудка в зависимости от числа выросших микробных колоний: до 10 колоний в чашке (+), 10-20 колоний (++) , 20-50 колоний (+++) , более 50 колоний (++++).

Успех бактериологической диагностики геликобактериоза во многом зависит от правильного взятия и транспортировки биологического материала. Так, по данным В.И.Минаева и соавт. (Клин. лаб. диагностика.-1999.- №11) при бактериологическом посеве биоптатов на питательную среду в эндоскопическом кабинете НР выделен в 100% случаев. При посеве этих же биоптатов в бактериологической лаборатории НР удалось выделить только в 70% случаев.

Проводилось сравнение выживаемости НР в 4 транспортных средах: физиологическом растворе, тиогликолевой среде, Pylogi-среде и среде Cary-Blair при температурах 20°C и 4°C.

Наиболее высокие цифры выживаемости отмечались на Pylogi-среде: 96-120 часов, практически независимо от температуры. На среде Cary-Blair выживаемость НР составляла 72-96 часов, причем при температуре 20°C выживаемость культур НР была на 1 сутки меньше. Тиогликолевая среда позволяла сохранять жизнеспособность НР при 4°C в течение 48 часов, а при температуре 20°C не более 1 суток. Физиологический раствор, независимо от температуры, не позволял выживать НР более 6 часов.

Таким образом, в зависимости от предполагаемых сроков доставки материала в лабораторию, может быть использована любая из апробированных транспортных сред. Вместе с тем посев биоптата в эндоскопическом кабинете является обязательным условием оптимального бактериологического исследования.

Бактериологический метод, к сожалению, дорог и его применение ограничено, в основном, научно-исследовательской работой.

Гистологический метод (специфичность - 97%, чувствительность - 80-90%) - прямой метод диагностики НР. Производится окраска гистологических препаратов, приготовленных из биоптатов слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки, акридиновым оранжевым, по Гимзе, Граму, толуидиновым синим, серебрением по Вартин-Старри и др.

Этот метод по праву можно назвать "Золотым стандартом" диагностики НР, поскольку он дает возможность как определить

наличие НР, так и оценить состояние слизистой оболочки желудка, поставить диагноз гастрита и классифицировать выявленные изменения по Сиднейской системе.

НР в препаратах можно оценить количественно: до 20 бактериальных клеток в поле зрения (при $\times 630$) - слабая степень обсеменения, до 50 - средняя, более 50 - высокая.

Для полноценной морфологической диагностики необходимо исследование нескольких биопсий слизистой оболочки и исследование серийных срезов. При оценке биопсий, взятых у больных после курса антигеликобактерной терапии, необходимо исследовать, как минимум, 2 биоптата из слизистой оболочки тела желудка и один биоптат из антрального отдела.

Преимуществами гистологического метода исследования являются: широкая доступность, удобство хранения и транспортировки препаратов и возможность ретроспективного анализа.

К недостаткам гистологического метода относится получение ложноотрицательных результатов (т.е. отсутствие НР в биоптате при наличии его в слизистой оболочке желудка). Это может быть связано с приемом пациентом анестетика, предшествующим приемом антисекреторных средств, препаратов висмута, антибиотиков, с обработкой биопсийных щипцов глутаральдегидом, скудным биоптатом без эпителия, участком кишечной метаплазии, плохой окраской. Кроме того, подготовка препаратов требует определенной затраты времени, а для проведения диагностики необходима хорошо оснащенная морфологическая лаборатория и квалифицированный персонал.

При приготовлении препарата в процессе фиксации и

обезвоживания биопсийного материала происходит отмывание слоя слизи, в которой и находятся НР. Это может привести к получению заниженных результатов обсемененности и даже получению ложноотрицательных результатов.

Существуют методы фиксации (например, в смеси Карнуа), позволяющие стабилизировать слой поверхностной слизи и снизить ее отмываемость с поверхности биоптата. Биопсийный материал после такой фиксации пригоден для изучения слизистого слоя и его компонентов, в том числе и бактерий. Однако он меньше подходит для исследования эпителия в световом микроскопе и абсолютно не пригоден для последующего изучения биоптата в электронном микроскопе, так как фиксаторы (спирт или уксусная кислота) существенно повреждают структуру тканей и клеток слизистой оболочки желудка. Улучшает сохранность слоя слизи добавление в фиксатор танниновой кислоты (1% раствор О-таннина). Однако, и в этом случае не исключается вымывание НР из слоя слизи.

Лишенной вышеназванных неудобств является оценка степени обсемененности при изучении мазка-отпечатка нативного биоптата, не подвергавшегося жидкостной обработке.

Цитологическая диагностика - выявление НР в мазках-отпечатках - значительно сокращает время получения результата и гораздо менее трудоемка. Сравнение степени обсемененности по мазку-отпечатку и гистологическому препарату выявило, что они соотносятся как 100% и 0 – 25% соответственно.

Предложен неинвазивный способ обнаружения НР путем бактериоскопии осадка тощачковой порции желудочного сока, полученного центрифугированием при 3-4 тыс.об./мин в течение 30-40мин, с последующей бактериоскопией мазка осадка, окрашенного

по методу Романовского-Гимзы (Дорофейчук В.Г. и соавт.//Клин. лабор. диагностика.-1997.-N8). Данный метод достаточно информативен, является неинвазивным, прост в исполнении и позволяет диагностировать НР в короткий срок (1,5 ч). Наряду с преимуществами данный метод обладает и рядом существенных недостатков: центрифугирование приводит к разрушению бактерий с образованием большого количества фрагментов, что затрудняет подсчет микроорганизмов; центрифугирование приводит к структурным повреждениям клеточной стенки бактерий с изменением ее антигенного состава, что создает трудности при проведении иммунологических методов диагностики НР; в связи с ограничением скорости вращения из-за повышенного разрушения бактерий, часть микроорганизмов остается в надосадке, следовательно снижается диагностическая возможность метода; при окраске по методу Романовского-Гимзы в осадке желудочного сока определяются не все формы бактерий в связи с интенсивно окрашенным фоном, что снижает чувствительность метода.

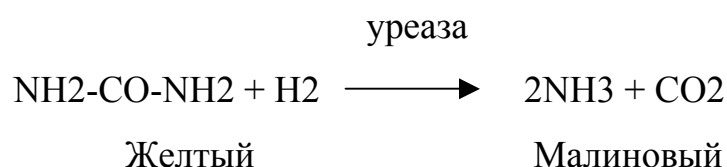
В Витебском государственном медицинском институте (Конорев М.Р., Литвяков А.М., Крылов Ю.В.) был разработан метод выявления НР, основанный на бактериоскопии мазков, полученных из осадка, надосадка, слизи, взвеси слущенных клеток покровного эпителия желудочного содержимого путем деления тощаковой порции желудочного сока под действием силы тяжести на компоненты (инкубация при комнатной температуре 15-20мин) с последующей окраской приготовленных мазков по методу Вартин-Старри (по собственному способу). Авторами также проведена сравнительная оценка методов обнаружения НР в мазках центрифугатов желудочного сока (1) и полученных с помощью

разделения под действием силы тяжести (2). Результаты таковы: по точности: 1 - 71%, 2 - 95%; по диагностической эффективности: 1 - 71%, 2 - 95%; по специфичности: 1 - 50%, 2 - 100%; по чувствительности: 1 - 85%, 2 - 92%. Таким образом, эффективность предложенного способа заключается в том, что он позволяет повысить точность, специфичность, чувствительность и предсказующую ценность определения НР в тощачовой порции желудочного содержимого и дает возможность определять любые формы микроорганизмов с сохранением структуры и антигенного состава бактерий.

Как уже отмечалось ранее, НР является продуцентом уреазы.

Для ее выявления предложены различные диагностические техники, которые часто называют *биохимическим методом*.

В диагностические среды, обязательно включающие мочевины и индикатор, помещают гастробиоптат. Уреаза разлагает мочевины до углекислого газа и ионов аммония, рН среды меняется, и индикатор меняет цвет.



Уреазный тест достаточно прост, позволяет быстро получить ответ (от нескольких минут до суток). Для его постановки не нужна

высокая квалификация медицинского персонала.

Однако уреазный тест относят к инвазивным методам, поскольку получить биоптат СОЖ возможно с помощью эзофагогастроскопии, что увеличивает также стоимость исследования.

В настоящее время имеются уреазные тесты промышленного производства (Де-нол тест, CLO-тест, Campy-тест, Среда Христенсена, Pylori Tek).

При использовании CLO-test (предложен одним из первых) биоптат размещают в агаре, содержащем мочевины и индикатор pH, гидролиз мочевины приводит к увеличению pH агара и вызывает изменение окраски в течение 24 ч.

Таблица 2.

Сравнительная характеристика уреазных тестов по Балобанову и соавт. 1996г.

Уреазный тест	Чувствительность, %	Специфичность, %
Среда Христенсена	92	99,4
CLO-test	99	100
Campy-test	98	100
Де-нол-тест	95	100

Коммерческие тесты отличаются высокой чувствительностью и специфичностью (таблица 2.), но имеют высокую стоимость, скорость их срабатывания составляет от 1 до 3 часов.

Можно изготовить диагностическую среду и в микробиологической или биохимической лаборатории. В российских "Рекомендациях по диагностике и лечению инфекции НР у взрослых при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки"

приведена пропись уреазного теста: мочевины - 2г, фенол-рот - (0,5%) 10мл, азид натрия - 20мг, доводят до 100 мл 0,01М фосфатным буфером, рН = 5,5.

Недостатком жидких уреазных тестов является необходимость предварительной подготовки рабочего раствора перед каждым исследованием, время срабатывания их от 1 часа до 1 суток. Общим недостатком вышеназванных тестов является использование в качестве индикатора фенолового красного, который имеет высокий рН перехода (6,8-8,4), что занижает чувствительность аналитической реакции.

В Ст-Петербурге разработан ХЕЛПИЛ-тест - уреазный тест на основе твердого пористого гигроскопичного волокнистого носителя (разработчик ООО АМА). Набор содержит карбамид в количестве от 0,2 до 5,0 г/дм², индикатор с несколько меньшим значением рН перехода (6,0-7,6) в количестве от 1 до 20 мг/дм². Тест позволяет зафиксировать в реакционной среде меньшее количество свободного аммиака, а, следовательно, и меньшее количество уреазы, т.е. повысить чувствительность теста. Биоптат слизистой оболочки желудка помещают на тест-билет и определяют степень уреазной активности по скорости появления, размерам и интенсивности окраски появляющегося синего пятна на желтом фоне. Тест-билет обладает капиллярными сорбционными свойствами и абсорбирует жидкость из биоптата, не окрашивая его и не нарушая его структуры, поэтому биоптат может быть использован для дальнейшего гистологического, бактериологического или бактериоскопического исследования.

Фирмой "Sigma Diagnostics" (Tunio A.M. et al.// Brit. J. Surg.-1995) разработан набор для определения аммиака и мочевины в

желудочном соке и определение их соотношения по формуле: $3 \times$ аммиак / мочеви́на. Этот метод может свидетельствовать об уреазной активности НР.

Гистологический и уреазный методы выявления НР невозможны без эзофагогастродуоденоскопии. Материалом для посева, как правило, также являются гастробиоптаты. Поэтому описанные методы исследования подвержены случайностям распределения НР по гастродуоденальной слизистой оболочке: ведь на исследование может попасть биоптат, в котором НР отсутствует. Бактерии, как правило, не встречается в краях язвы желудка и двенадцатиперстной кишки. Поэтому биоптаты, взятые из краев дефекта слизистой оболочки, мало информативны. Особенно сложно выявляется микроорганизм после лечения блокаторами протонной помпы, монотерапии препаратами, содержащими висмут, лечения антибиотиками, проведенного по любому показанию.

Избежать ложноотрицательных результатов помогает множественная биопсия. Причем местом взятия биоптатов является не только антральный отдел, но и тело желудка. Чувствительность гистологического метода при использовании двух биоптатов из разных отделов желудка достигает 100%. H.Lamouliatte et al. для рутинного обследования рекомендуют брать 5-7 биоптатов.

К неинвазивным способам диагностики НР относятся *радионуклидные* методы, которые также являются косвенными. Это уреазные дыхательные тесты с мочевиной, меченной изотопами углерода ^{13}C , ^{14}C .

Чувствительность этого метода 100%, специфичность 92%. Так как для дыхательного теста не требуется эзофагогастроскопия, этот метод применим у пациентов, которым она противопоказана.

Меченая мочеви́на дается пациенту в составе пробного завтрака. Уреаза НР разлагает мочеви́ну до углекислого газа, сохраняющего меченый углерод. Попадая в легкие, углекислый газ выводится с выдыхаемым воздухом. Пациент выдыхает в специальную пробирку-контейнер, а пробу воздуха направляют на анализ. Для регистрации приращения количества меченного CO₂ в выдыхаемом воздухе используют масс-спектрометр.

¹⁴C - радиоактивный изотоп. Его использование имеет ряд ограничений (не может быть использован у детей и беременных женщин и подчиняется строгому контролю), поэтому этот вариант методики менее распространен. ¹³C не радиоактивен, и может быть использован как для обследования детей, так и при эпидемиологических исследованиях больших контингентов населения.

Дыхательные тесты не подвержены ошибкам, связанным с особенностями методов, использующих гастробиоптаты. Они дают представление обо всей слизистой оболочке желудка, а не об отдельном ее фрагменте. Поэтому в странах, где налажена методика проведения дыхательного теста, ее рекомендуют для проведения контроля эффективности эрадикационной терапии НР-инфекции.

Ограничивает внедрение в практику этого метода исследования высокая стоимость масс-спектрометра. Существуют другие пути регистрации изотопа, в частности, на основе лазерной технологии.

Радионуклидную диагностику НР можно осуществлять путем определения изотопа ¹⁵N в моче обследуемого после приема внутрь

мочевины (3 мг/кг микробных тел), меченной ¹⁵N. Чувствительность метода составляет 96%, специфичность - 100%. Однако методика эта редкая и не имеет широкого распространения.

С помощью *иммунологических методов* определяют микробные антигены и антитела к НР в сыворотке крови и в биоптатах слизистой оболочки желудка.

Используют методы флюоресцирующих антител и непрямой иммунофлюоресценции, иммуноферментный метод и реакцию агглютинации или связывания комплемента. Специфичность этих методов варьирует от 75 до 100%, чувствительность - от 87 до 98%

Выявление НР в гастробиоптатах можно проводить иммуногистохимически. Благодаря использованию моноклональных антител, специфичность такой диагностики становится стопроцентной. Иммуногистохимический метод применяется в научных исследованиях, в которых может потребоваться такая степень специфичности. Однако в клинической практике он не "прижился", поскольку это трудоемкий метод, рассчитанный на высококвалифицированный персонал.

В настоящее время разработан целый ряд серологических тестов, смысл которых заключается в определении антител IgM, IgG, IgA к НР в крови.

Самым распространенным методом иммунологической диагностики НР является *иммуноферментный анализ* - ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). Метод неинвазивный и косвенный. Этот метод был разработан, как описывают Newell и соавт., с использованием экстракта кислоты одного из штаммов НР путем его соединения со всеми классами иммуноглобулинов.

Чувствительность теста ELISA по данным P.R. Hawtin и соавт. составляет 90%, а специфичность - 83%.

В настоящее время имеются тестовые наборы промышленного изготовления, которые различаются антигеном: полученный с помощью ультразвука гомогенат целых клеток бактерий или очищенные антигены из одного или нескольких штаммов, например уреазы НР. Для иммуноферментного анализа требуется несколько микролитров сыворотки крови. В оборудованной лаборатории можно одновременно обработать десятки проб крови.

Диагностическая ценность различных наборов ELISA в двух модификациях - уреазной и глициновой с коммерческими названиями GAP-IgG, HelpTEST, HELICO-G, Pyloriset, ROCHE и т.д. приблизительно одинакова.

Иммуноферментный анализ - наиболее подходящий метод для эпидемиологических обследований и скрининга. Однако для контроля эффективности эрадикационной терапии НР-инфекции серологическая диагностика не может быть рекомендована. Антитела к НР в крови не всегда свидетельствуют о присутствии активной инфекции в слизистой оболочке желудка. Они могут иметь следовой характер. Только в том случае, если использована количественная методика иммуноферментного анализа и есть возможность сравнить уровень антител после лечения с исходным уровнем, можно сделать определенные выводы. Информативным считается более чем 50% падение титра антител при анализе крови, взятой через 6 месяцев после окончания курса антигеликобактерной терапии.

Несомненно, что ожидание результата антимикробной терапии в течение такого длительного периода времени, не может удовлетворить клиницистов. К недостаткам данного метода можно

также отнести трудность организации забора и хранения двух проб крови, кроме того, количественные методы иммуноферментного анализа менее доступны и не имеют широкого распространения.

В последние годы появились диагностические наборы для серологического анализа, которые позволяют оценить патогенность штаммов НР. Так, штаммы, характеризующиеся цитотоксиноссоциированным белком CagA чаще обнаруживаются у больных язвенной болезнью и раком желудка. CagA вызывает выраженный иммунный ответ. В настоящее время доступны тесты, использующие его в качестве диагностического антигена.

Недавней разработкой являются "настольные", "офисные" качественные тесты для обнаружения антител к НР. Они основаны на латекс-агглютинации или твердофазном иммуноферментном анализе. Для исследования нужна капля периферической крови. Оценка результата производится через минуту. Никаких дополнительных реактивов не требуется. Несмотря на уникальную простоту их выполнения, место этих методик в диагностике НР пока не определено, поскольку тестовые наборы достаточно дороги.

Существуют методики определения уровня пепсиногенов I и II (или A и C) в крови и их соотношения (Dotto P., et al.//Curr. Ther. Res.-1995; Yahav J., et al.// Israel J. med. Sci.-1996) для диагностики инвазии и эрадикации НР. При этом для диагностики инвазии НР оценивается повышение уровня пепсиногена II (C), а его снижение при лечении более чем на 25 % подтверждает успешную элиминацию (Biasco G., et al.1993; Plebani M. et al. // J. clin. Lab Anal.-1996).

Имеются методики определения антител к НР в слюне и кале.

Возможности их интенсивно изучаются.

Методом иммуноэлектрофореза в геле изучены антигенный состав, относительное содержание и специфичность термолабильных и термостабильных антигенов НР. Установлено, что в составе лизатов НР содержится не менее 7 четко выраженных антигенов, 5 из которых являются термолабильными и, по видимому, имеют белковую природу. 2 других антигена относительно термостабильны: мажорный антиген и ЛПС, являющиеся специфическими маркерами НР.

На основе специально приготовленных к ним антисывороток разработана тест-система для выявления этих маркеров НР непосредственно в биологическом материале от больных (слюна, копрофильтраты, кровь). Данный тест является специфическим, так как выявляет маркер самого возбудителя в биологическом материале, доступен для малооснащенных лабораторий, экономичен. Он может быть использован в качестве безопасного скринингового метода до эндоскопического исследования, многократно, для мониторинга циркуляции антигенов в ходе заболевания и полуколичественного их определения, при выборе и оценке эффективности средств эрадикационной терапии, для научных исследований патогенеза и иммуногенеза заболеваний, ассоциированных с НР. (Ю.А. Белая и соавт. 1999г).

Полимеразная цепная реакция (ПЦР) дает возможность идентифицировать видоспецифичный для НР фрагмент ДНК.

Уникальность этого молекулярно-генетического метода диагностики состоит не только в высокой специфичности, но и в том, что материалом для него являются и биоптаты слизистой оболочки желудка, и желудочный сок, и смывы с поверхности ротовой полости, и зубной налет, и копрофильтраты.

Доступность праймеров, отлаженная техника проведения анализа позволят использовать ПЦР для диагностики НР так же широко, как и для диагностики вирусов гепатита. Этот метод незаменим, так как дает возможность типировать и дифференцировать штаммы бактерии, что позволяет осуществлять их эпидемиологическое изучение, отличать случаи реинфекции от рецидива, определять устойчивость к антибиотикам. Ограничением в использовании этого метода в клинических условиях служит применение дорогостоящего оборудования и высококвалифицированного персонала. Поэтому, выявление НР методом ПЦР чаще всего проводится в научно-исследовательских целях.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Ansorg R., Vonvecklinghausen G., Vonhhainegg E.H.*//J. Antimicrob. Chemother. 1996. - Vol. 37, N1. - P.45-52.
2. *Biasco G., et al.*1993; *Plebani M. et al.*//J. clin. Lab Anal.-1996.
3. *Dotto P. et al.*//Curr. Ther. Res.-1995.
4. *Ishii E.*// Zbl. Bakteriол. - 1993. - Bd 280, N 1-2. - S. 239-243.
5. *Khulusi S., Ahmed H.A., Mendall M.A. et al.*// Endoscopy. 1995. - Vol.27. - P. 664-666.
6. *Yahav J., et al.*// Israel J. med. Sci.-1996.
7. *Балобанов В.Ю. и соавт.* // Росс жур. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. - 1996. - N 4. - С. 80-85.
8. *Григорьев П.Я., Яковенко Э.П.* // Клин. мед. - 1998. - N 6. - С. 11-15.
9. *Дорофейчук В.Г. и соавт.*//Клин. лаб. диагностика. - 1997. - N 8. - С. 42-44.
10. *Корниенко Е.А. и соавт.* // Росс. вестн. перинатол. и педиатрии. - 1998. - N 5. - С. 34-36.
11. *Минаев В.И. и соавт.*//Клин. лаб. диагностика. - 1999. - N11. - С.20.
12. *Морозов И.А.*//Росс жур. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. - 1999. - N 2. - С.46-48.
13. *Островский И.М.* // Терап. архив. - 1998. - N 2. - С. 73-76
14. *Татаринов П.А., Грацианская А.Н.*// Педиатрия. - 1998. - N 2.С. 92-97.

- 15.Циммерман Я.С., Зиннатулин М.Р. // Клин. мед. - 1997. - N 4. С. 8-13.
- 16.Щербаков П.Л.//Росс жур. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. - 1999. - N 2. - С.8-11.
- 17.Рекомендации по диагностике *Helicobacter pylori* у больных язвенной болезнью и методам их лечения // Росс жур. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. - 1999. - N1. - С. 105-107.
- 18.Роль заражения *Helicobacter pylori* в этиопатогенезе болезней верхнего отдела пищеварительного тракта// Аналитико-информационный бюллетень. Информация по медицине. - 1995. - N 1. - С. 45-50.
- 19.*Helicobacter pylori*: революция в гастроэнтерологии. // под ред. акад. РАМН В.Т. Ивашкина.- М., "Триада-Х".- 1999.-255 стр.