

УДК 616.98-078-074-08

**СРАВНЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОГО,
ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО И ИММУНОГИСТОХИМИЧЕСКОГО МЕТОДОВ
ДЛЯ КОНТРОЛЯ ЭРАДИКАЦИИ HELICOBACTER PYLORI-ИНФЕКЦИИ****¹А. В. Воропаева, Е. В. Воропаев², С. Л. Ачинович³****¹Республиканский научно-практический центр радиационной медицины
и экологии человека, г. Гомель****²Гомельский государственный медицинский университет****³Гомельский областной клинический онкологический диспансер**

Исследованы возможности полимеразной цепной реакции, иммуногистохимического и морфологического методов для контроля эрадикации *Helicobacter pylori*, определены чувствительность и специфичность методов. Показано, что контроль эффективности проводимой терапии *Helicobacter pylori* следует проводить, используя метод полимеразной цепной реакции, обладающий высокими аналитическими характеристиками (чувствительность — 84 % и специфичность — 100 %), относительной простотой исполнения и экономичностью.

Ключевые слова: инфекция *Helicobacter pylori*, эрадикационная терапия, полимеразная цепная реакция (ПЦР), гистологический метод, иммуногистохимический анализ (ИГХ).

**COMPARISON OF MOLECULAR-GENETIC TECHNIQUES, HISTOLOGICAL
AND IMMUNOHISTOCHEMICAL METHODS OF ANALYSIS FOR CONTROL
OF ERADICATION OF HELICOBACTER PYLORI -INFECTION****A. V. Voropaeva¹, E. V. Voropaev², C. L. Achinovich³****¹Republican Research Center of Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel****²Gomel State Medical University****³Gomel Regional Clinical Oncology Center**

Helicobacter pylori detection after its eradication by polymerase chain reaction, immunohistochemical, morphological methods have been studied, the sensitivity and specificity of the methods have been determined. Treatment effectiveness should be monitored by PCR, which has high sensitivity (84 %) and specificity (100 %), simplicity and low cost compared with other methods described in this article.

Key words: infection *Helicobacter pylori*, eradication therapy, polymerase chain reaction (PCR), histological, immunohistochemical analysis (IGH).

Введение

Широкая распространенность инфекции *Helicobacter pylori* и ее связь с развитием хронического гастрита, пептических язв, MALT-лимфомы и рака желудка делают точную диагностику хеликобактерной инфекции важной практической задачей [5]. В настоящее время в отношении *Helicobacter pylori* не существует метода лабораторной диагностики, обладающего 100 % чувствительностью и специфичностью. Каждый из используемых методов имеет свои недостатки и преимущества, которые и определяют его показания к применению в клинической практике. Маастрихтский консенсус-3 установил, что эрадикация *Helicobacter pylori* является важным направлением профилактики рака желудка и может уменьшить риск развития предраковых изменений слизистой оболочки желудка (СОЖ). Согласно рекомендациям этого же консенсуса, лицам, у которых *Helicobacter pylori* выявляется повторно после

эрадикации, необходимо провести лабораторную оценку антибиотикорезистентности с целью подбора адекватной схемы эрадикационной терапии.

Контроль эрадикационной терапии в Республике Беларусь, к сожалению, никак не регламентируется. Основными методами диагностики эффективности проводимого лечения по-прежнему остаются быстрый уреазный тест и гистологическое исследование. Применение быстрого уреазного теста в данном случае является неэффективным, так как при применении антибиотиков бактерия приобретает кокковую форму и не продуцирует уреазу [2].

Диагностическая ценность гистологического теста выше и несомненным его достоинством является возможность изучения состояния СОЖ. Однако использование только гистологического исследования в данном случае малоэффективно из-за низкой чувствительности метода, обусловленного опять же присут-

ствием кокковых форм. Иммуногистохимический метод (ИГХ) обладает лучшими по сравнению с гистологическим методом аналитическими характеристиками, являясь более специфичным, но также имеет свои ограничения и недостатки. Для ИГХ-реакций используют как поли-, так и моноклональные антитела. Недостаток данного метода связан с применением поликлональных антител, получаемых из антисывороток иммунизированных животных, у которых могут формироваться различные дополнительные иммуноглобулины, дающие неспецифические реакции. Кроме того, цена реагентной базы и соответствующих расходных материалов достаточна высока. Себестоимость одного иммуногистохимического теста составляет около 100 тыс. бел. рублей. Следует отметить, что при диагностике процессов, связанных с *Helicobacter pylori*, в Республике Беларусь применяются как раз поликлональные антитела. Моноклональные антитела, напротив, обладают абсолютной специфичностью по отношению к искомому антигену и не дают перекрестной реактивности. Но их применение на тканях, фиксированных в формалине, не представляется возможным. Наряду с этим цена исследований с использованием моноклональных антител вырастает еще значительно. В то же время, несмотря на все сложности, данный метод зачастую считается как наиболее истинный и рядом авторов относится к «золотому стандарту» в данной области диагностики [10].

Реагенты и расходные материалы для иммуногистохимического исследования выпускаются рядом зарубежных компаний, таких как NOVOCASTRA LABORATORIES (Великобритания), ABCAM (Великобритания), CHEMICON (США), PHARMINGEN (США) и DAKO Cytomation (Дания). Последняя представлена на рынке диагностических услуг в Республике Беларусь, и именно эти реагенты были использованы в нашей работе.

В настоящее время большое практическое значение имеют неинвазивные методы диагностики заболеваний. Применительно к *Helicobacter pylori* разработан тест определения бактериальной ДНК в кале посредством ПЦР [6]. Анализ литературных данных относительно возможного применения этого теста с целью контроля эрадикационной терапии показал его низкую чувствительность — от 53 % [3] до 80 % [4] по данным российских исследователей и от 60 % [8] до 73 % [9] по данным зарубежных исследователей. Низкая чувствительность теста в данном случае объясняется наличием в пробах фекалий полисахаридов — естественных ингибиторов ПЦР [8]. Кроме того, выполнение пробоподготовки и выделения ДНК связано с необходимостью проведения дополни-

тельной очистки и концентрирования полученных препаратов [9]. Проведение ПЦР в биопсийном материале, несмотря на инвазивность, лишено вышеназванных недостатков неинвазивного варианта диагностики. Себестоимость одного ПЦР-исследования составляет около 40 тыс. бел. рублей. Реагентная база представлена широким спектром ПЦР тест-систем Российского производства, позволяющих диагностировать *Helicobacter pylori*: ФГУН Роспотребнадзора, Литех, ДНК-технологии, Вектор-Бест, Биоком.

Цель исследования

Сравнить аналитические характеристики методов, используемых для выявления маркеров *Helicobacter pylori* после проводимой терапии.

Материалы и методы

Проведена оценка эрадикационной терапии в биоптатах СОЖ с параллельным использованием гистологического, ИГХ-методов и ПЦР. Выявление ДНК *Helicobacter pylori* методом ПЦР проводили, используя коммерческий набор реагентов «АмплиСенс *Helicobacter pylori*-EPh» (ФГУН Роспотребнадзора, Россия). Для гистологических исследований использовали окраску по Романовскому-Гимза. ИГХ-исследование проводили с использованием поликлональных кроличьих антител против *Helicobacter pylori* (Дакко Cytomation, Дания).

Обследовано 72 пациента (средний возраст $43,1 \pm 9,9$) с *Helicobacter pylori*-ассоциированной патологией, проходивших стандартную эрадикационную терапию.

Статистическая обработка результатов проводилась с применением пакета прикладных программ MedCalc 11.3.0.0., с помощью которого выполняли ROC-анализ. Рассчитывался 95 % доверительный интервал (95% ДИ) площади под кривой, для сравнения двух ROC-кривых использовался метод DeLong et al., 1988. Различия считались значимыми при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

При исследовании методом ПЦР ДНК *Helicobacter pylori* выявлена в 38 (52,8%), ИГХ-методом антигены *Helicobacter pylori* выявлены в 42 (58,3 %), гистологическим методом бактерия *Helicobacter pylori* выявлена в 25 (34,7 %) исследуемых образцах. При сравнении ПЦР и ИГХ-методов необходимо учитывать, что ПЦР, выявляя непосредственно ДНК *Helicobacter pylori*, является прямым методом. Принцип ИГХ-метода основан на специфичном связывании антител к *Helicobacter pylori* с антигенами клеточной стенки бактерии, которые затем визуализируют с помощью химической реакции. Оценка полученных данных в некоторых случаях может носить субъективный характер. В проводимом исследовании результаты ИГХ-исследования, оцененные морфологом как плюс-минус (сомнительно пози-

тивные клетки), нами учитывались как положительные. Соответствие результатов ИГХ-метода и метода ПЦР наблюдалось в 86,1 % случаев. Положительные результаты ИГХ-исследования были отмечены нами в 7 образцах (9,7 %) при отрицательном результате ПЦР-исследования. В то же время в 3 исследуемых образцах (4,2 %) наблюдали положительный результат методом ПЦР при отрицательном ИГХ-исследовании.

Выделена группа из 45 пациентов, у которых один или оба теста дали положительный результат. Чувствительность и специфичность гистологического, ИГХ-методов и ПЦР (%; 95 % ДИ) определена с помощью программы MedCalc.

Чувствительность ИГХ-метода составила 93,3 % (81,7–98,7 %), специфичность — 100,0 %

(81,7–100,0 %). Площадь под ROC-кривой составила 0,967 (0,895–0,994) (рисунок 1).

Чувствительность метода ПЦР составила 84,4 % (70,5–93,5), специфичность — 100,0 % (87,2–100,0). Площадь под ROC-кривой составила 0,922 (0,834–0,972) (рисунок 2).

Чувствительность морфологического метода составила 53,3 % (37,9–68,3), специфичность — 96,3 % (81,0–99,9). Площадь под ROC-кривой составила 0,748 (0,632–0,843) (рисунок 3).

При сравнении двух (ИГХ-метод и ПЦР) ROC-кривых с помощью методики DeLong et al., 1988, выявлено отсутствие значимых различий (95 % ДИ -0,0240–0,113; $p = 0,203$), что говорит о высокой диагностической ценности используемых методов.

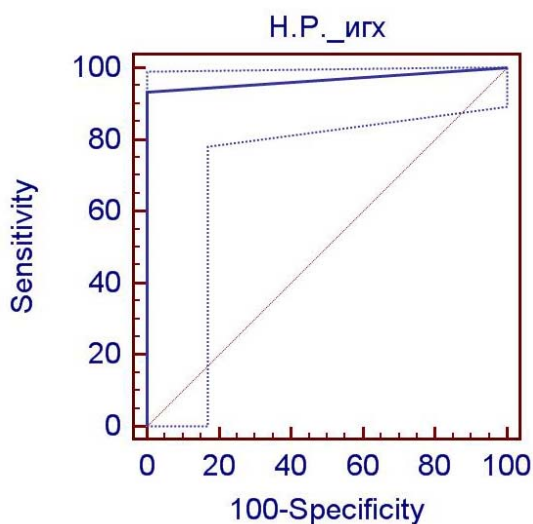


Рисунок 1 — ROC-кривая метода ИГХ

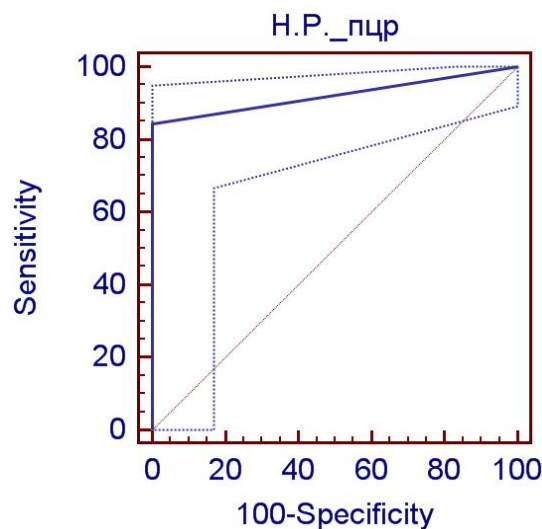


Рисунок 2 — ROC-кривая метода ПЦР

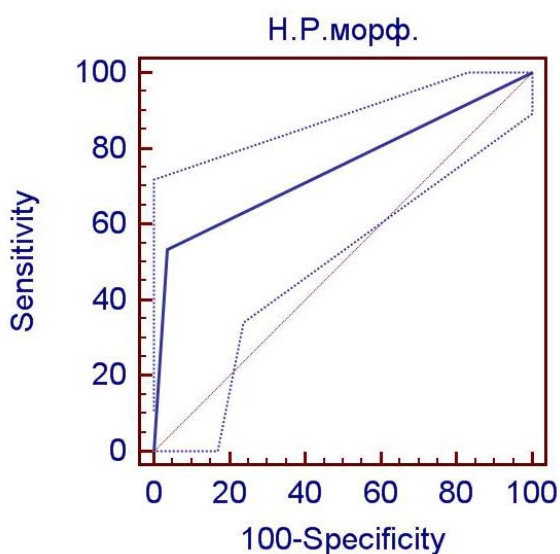


Рисунок 3 — ROC-кривая гистологического метода

При сравнении двух (ИГХ и гистологический методы) ROC-кривых различия площади

под кривой составили 0,219 (95 % ДИ 0,132–0,305; $p < 0,001$). Различия площади под кри-

вой для ПЦР и гистологического метода составили 0,174 (95 % ДИ 0,091–0,258; $p < 0,001$).

Проведенные исследования с использованием ПЦР и ИГХ-методов показали высокие прогностические результаты. В результате ИГХ-исследования только те бактериальные клетки, которые имеют антигены, специфичные для

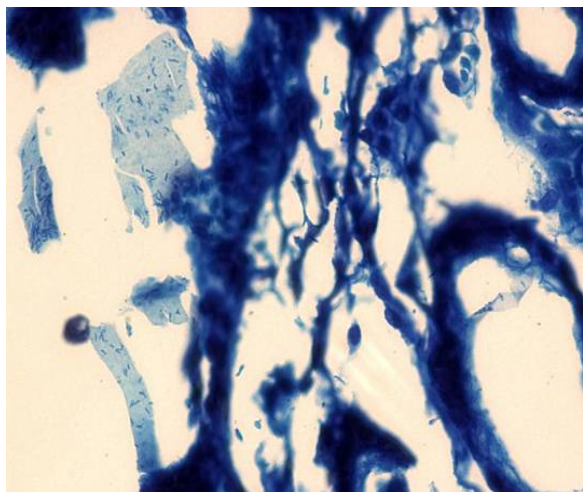


Рисунок 4 — Гистологическое определение *Helicobacter pylori*. Окраска по Романовскому-Гимзе; Хронический гастрит 1 ст. активности. Экспрессия рецепторов к *H. pylori* +++.
Пациент 3. Увеличение X 40

Helicobacter pylori, в том числе и кокковые формы, характерно окрашены. При неудачном взятии материала чувствительность метода снижается. На рисунке 4 представлено предварительное гистологическое исследование биоптатов, с окраской по Романовскому-Гимза, на рисунке 5 — результат ИГХ-исследования.

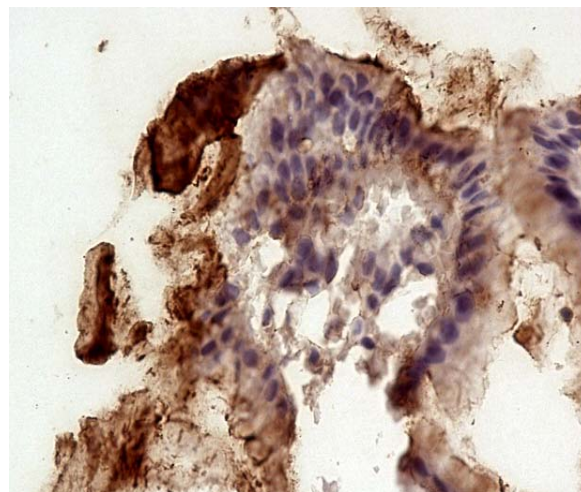


Рисунок 5 — Иммуногистохимическое определение антигена *Helicobacter pylori*. Резко позитивная реакция. Хронический слабовыраженный гастрит 1 ст. активности. Экспрессия рецепторов к *H. pylori* +++.
Пациент 3. Увеличение X 40

Несмотря на высокие прогностические показатели, ИГХ-метод не всегда может дать однозначный ответ о наличии или отсутствии маркеров, в данном случае антигена *Helicobacter pylori*. Использование ИГХ-метода возможно только в комплексе с другими методами, позволяющими детектировать те или иные маркеры данного микроорганизма. К таким методам, безусловно, должны быть отнесены молекулярно-генетические методы, а именно метод ПЦР [7].

Применение ПЦР для выявления ДНК *Helicobacter pylori* после проведения эрадикационной терапии является обоснованным и наилучшим из методов лабораторной диагностики. Метод ПЦР обладает высокой чувствительностью и позволяет выявлять единичные бактерии как в вегетативной, так и кокковой форме. Несомненное достоинство данного метода — возможность быстрого определения (в течение 2–3 дней) непосредственно бактерии *Helicobacter pylori* и устойчивых генотипов с целью подбора адекватной эрадикационной терапии. Наличие вероятных ложноотрицательных результатов может быть связано с низкой обсемененностью бактериями СОЖ, «потерей» ДНК при выделении, неправильным забором биоптата для исследования.

Заключение

Таким образом, с учетом высоких прогностических показателей ПЦР (чувствительность 84,4 %, специфичность — 100 %) и невысокой себестоимости применение данного метода обосновано в качестве контроля успешности проводимой эрадикационной терапии. В настоящее время отечественная лабораторная служба может проводить весь комплекс исследований с использованием метода ПЦР. Имеющиеся на рынке лабораторных услуг ПЦР тест-системы для диагностики *Helicobacter pylori* при высокой чувствительности и специфичности относительно недороги и просты в использовании.

Для контроля эрадикации может использоваться также и ИГХ-метод, однако его применение существенно повышает стоимость исследования.

Использование только гистологического метода для контроля эрадикации, без подтверждения результатов другими методами, нецелесообразно. Диагностическая ценность гистологического метода заключается в оценке специфических изменений СОЖ (гастрит, язвы, метаплазия, дисплазия и др.), следовательно, данный метод должен быть «вторым» используемым для контроля эрадикации методом.

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Аруин, Л. И. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника / Л. И. Аруин, Л. Л. Капуллер, В. А. Исаков. — М., 1998. — 496 с.
2. Helicobacter pylori-инфекция: современные аспекты диагностики и терапии: пособие для врачей / Л. В. Кудрявцева [и др.]. — М., 2004. — С. 31.
3. Паролова, Н. И. Сравнительная оценка эффективности современных методов диагностики инфекции Helicobacter pylori / Н. И. Паролова, Е. А. Корниенко, М. А. Дмитриенко // Педиатрия. — 2008. — № 1. — С. 4–6.
4. Алгоритм современной диагностики и лечения хеликобактерной инфекции у детей с заболеваниями верхних отделов пищеварительного тракта / П. Л. Щербаков [и др.] // Педиатрия. — 2003. — № 6. — С. 1–5.
5. Association of H. pylori infection with gastric carcinoma: A meta-analysis / G. D. Eslick [et al.] // Am. J. Gastroenterol. — 1999. — № 94. — P. 2373–2379.
6. Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection // P. Malfertheiner [et al.] // The Maastricht III Consensus Report. — 2007. — № 56. — P. 772 p.
7. Detection of Helicobacter pylori gastritis by PCR: correlation with inflammation scores and immunohistochemical and CLOtest findings J. Weiss [et al.] // American Journal of Clinical Pathology. — 2008. — Vol. 129 (1). — P. 89–96.
8. Detection of Helicobacter pylori in stool specimens: comparative evaluation of nested PCR and antigen detection / S. Mishra [et al.] // The Journal of Infection in Developing Countries. — Vol. 2, № 3. — P. 206–208.
9. Detection of Helicobacter pylori DNA in Fecal Samples from Infected Individuals / A. William [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. — 1999. — Vol. 37, № 7. — P. 2236–2240.
10. Helicobacter pylori In Gastric Biopsies: Which Is The Best Staining Method? F. Kacar [et al.] // The Internet Journal of Pathology. — 2004. — Vol. 3, № 1.

Поступила 31.05.2010

УДК 616.12-005.4-036.838

СОВРЕМЕННАЯ ОЗДОРОВИТЕЛЬНАЯ ТЕХНОЛОГИЯ В РЕАБИЛИТАЦИИ БОЛЬНЫХ ИШЕМИЧЕСКОЙ БОЛЕЗНЬЮ СЕРДЦА

Л. С. Ковальчук², В. Я. Латышева¹, П. Н. Ковальчук¹

¹Гомельский государственный медицинский университет

²Санаторно-курортная организация РУП «Гомельское отделение
Белорусской железной дороги»

В работе дано физиологическое обоснование применения озонотерапии в реабилитации больных ишемической болезнью сердца, по данным отечественных и зарубежных исследователей.

Названная оздоровительная технология является весьма эффективным, перспективным и экономически малозатратным методом.

Ключевые слова: озон, озонотерапия, ишемическая болезнь сердца, перекисное окисление липидов, липидный обмен, медицинская реабилитация.

CONTEMPORARY HEALTH PROMOTION TECHNOLOGY IN THE REHABILITATION OF PATIENTS WITH ISCHAEMIC HEART DISEASE

L. S. Kovalchuk², V. Y. Latysheva¹, P. N. Kovalchuk¹

¹Gomel State Medical University

²Treatment and Health Organization Republican Unitary Venture
«Gomel Department of Belarusian Railway»

In the article there is a physiological substantiation of the application of ozonotherapy in the rehabilitation of the patients with ischaemic heart disease based on the data of foreign researches and those from our country.

The mentioned health promotion technology is an effective perspective and economically efficient method.

Key words: ischaemic heart disease, medical rehabilitation, ozone, ozonotherapy, peroxidation of lipids, lipidic exchange.

Высокая распространенность, большая длительность и рецидивирующее течение ишемической болезни сердца (ИБС), сочетанность и множественность ее проявлений, неоднократное и длительное стационарное лечение обуславливают необходимость проведения восстановительного лечения больных с этой патологией на стационарном, амбулаторно-поликлиническом и санаторном этапах [2, 11].

По оценкам Всемирной организации здравоохранения, ежегодно во всем мире от сердечно-сосудистых заболеваний погибают более 17 млн. человек, из них от ИБС — более 7 млн.

К 2020 г. это заболевание станет ежегодной причиной смерти более 11 млн. человек [12].

Непрерывный рост числа больных ИБС и наиболее распространенной клинической ее формой — стенокардией (СК), их омоложение наряду со значительными социальными последствиями (увеличение заболеваемости, инвалидности и смертности) приводят к повышению затрат органов здравоохранения и социальной защиты как в Беларуси, России, так и во всем мире. ИБС становится не только важной медико-социальной проблемой в масштабах государства, но и событием, значительно