

Р. А. Шамсутдинова, А.Я. Чепурных, Е.А. Савиных, Н.В. Коновалова, А.В. Бикметова
ИНФИЦИРОВАНИЕ HELICOBACTER PYLORI: МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Кировская государственная медицинская академия

R.A. Shamsutdinova, A.J. Chepurnykh, E.A. Savinykh, N.V. Konovalova, A.V. Bikmetova

HELICOBACTER PYLORI INFECTION: METHODS OF DIAGNOSIS

Kirov state medical academy

Хеликобактерная инфекция - одна из значимых причин развития заболеваний желудка и двенадцатиперстной кишки. В статье дан обзор основных методов диагностики инфицированности *Helicobacter pylori*.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, инфицирование, методы диагностики.

Helicobacter pylori infection is one of the most important causes of the stomach and duodenum diseases. The paper reviews the main methods of diagnosing *Helicobacter pylori* infection.

Key words: *Helicobacter pylori*, infection, diagnostic methods.

Одной из серьезных проблем в гастроэнтерологии является хеликобактерная инфекция. Большое значение *Helicobacter pylori* (HP) играет в развитии таких заболеваний гастродуоденальной зоны, как хронический гастрит, язвенная болезнь, полипоз и рак желудка. Частота инфицирования HP прогрессивно возрастает. С момента открытия существования данного микроорганизма было разработано множество методов его диагностики, которые постоянно подвергаются усовершенствованию. Тем не менее, ни один из методов диагностики хелико-бактерной инфекции не является универсальным.

Диагностические возможности различных методик могут ограничиваться возрастом и индивидуальными особенностями пациента, стадиями заболевания, чувствительностью, техническим обеспечением, временем проведения, стоимостью. В связи с чем для более точной диагностики наличия ЦР необходимо использование минимум двух методов. Ряд авторов рекомендует использование трех методик для уточнения отсутствия инфекции [24]. Все многообразие методов обнаружения хеликобактерной инфекции основано на определении собственно *Helicobacter pylori* (прямые методы) либо продуктов его жизнедеятельности (косвенные методики) (таб. 1.1) [1, 2].

Таблица № 1.1
Методы диагностики *Helicobacter pylori*

Прямые	Косвенные
Бактериологический метод	Уреазный тест
Гистологический метод	Серологический метод
Молекулярно-биологический метод исследования биоптатов (полимеразная цепная реакция)	
Молекулярно-биологический метод исследования кала (полимеразная цепная реакция)	
Фазово-контрастная микроскопия	
Иммуногистохимический метод	

Также среди большого количества методов диагностики данного микроорганизма можно выделить инвазивные и неинвазивные (таб. 1.2). Инвазивные методики требуют проведения фиброгастродуоденоскопии, взятия биопсийного материала и, как правило, используются при прохождении комплекса первичных диагностических мероприятий. Неинвазивные тесты обнаружения *Helicobacter pylori* в настоящее время с учетом современных рекомендаций ведения пациентов с диспепсией приобретают все большую значимость.

Таблица № 1.2 Методы диагностики *Helicobacter pylori*

Инвазивные	Неинвазивные
Бактериологический метод	Иммунологический метод (определение антител к HP в кале, слюне, моче)
Морфологические: -гистологический -цитологический	Молекулярно-биологический метод исследования кала, слюны, зубного налета (полимеразная цепная реакция)

Быстрый уреазный тест	Дыхательные тесты (уреазный, аммиачный)
Молекулярно-биологический метод исследования биоптатов (полимеразная цепная реакция)	
Фазово-контрастная микроскопия	
Иммуногистохимический метод	
Серологический метод (ИФА)	

Наиболее широко распространенными методами диагностики НР считаются гистологическое, гистобактериологическое и иммуногистохимическое исследование гастробиоптатов и их отпечатков на предметном стекле [3, 9, 12, 19, 21, 22]. В случаях невозможности проведения эзофагогастроудоденоскопии отдается предпочтение неинвазивным методам (дыхательному уреазному тесту, серологическому методу, ПЦР). Для контроля эффективности эрадикации оптимальным является применение дыхательных тестов. Альтернативой может служить исследование кала моноклональными антителами [12].

Инвазивные методики

Бактериологический (культуральный) метод является одним из наиболее информативных и специфичных методов. Специфичность его составляет практически 100%, чувствительность более 90% [20, 28, 31]. Данная методика также позволяет определять антибиотикорезистентность БР и проводить динамические наблюдения за ней, проводить внутривидовое типирование штаммов для дифференциальной диагностики рецидивирования и реинфекции новыми штаммами [25, 28]. Бактериологический метод применяется в научной практике для изучения факторов патогенности *Helicobacter pylori*, изготовления препаратов серологической диагностики, создания банков штаммов для эпидемиологических исследований. Однако данный метод обладает рядом технических сложностей, ограничивающих его применение: отсроченное получение результатов на 7-10 дней, трудность транспортирования материала для сохранения жизнеспособности микроорганизма, высокие требования к условиям культивирования, снижение эффективности высевания при низкой обсемененности и отсутствии визуальных признаков воспаления, дорогостоящее оборудование [25]. Недостатком данного метода считается неспособность выявлять кокковые формы *Helicobacter pylori* [7], тогда как в настоящее время в достаточно высоком проценте случаев у БР-позитивных пациентов в слизистой оболочке желудка преобладают именно кокковые формы возбудителя. В широкой клинической практике данный метод не применяется. Однако в связи с быстрым развитием резистентности НР к антибактериальным препаратам все больше исследователей считают необходимым определение чувствительности перед проведением лечения [16, 26]. Это значительно повышает значимость бактериологического метода.

Морфологические методы

1) *Гистологический метод выявления Helicobacter pylori* считается «золотым стандартом» диагностики инфекции. Его специфичность оценивается как 97%, а чувствительность - 80-90%. Используя именно этот метод, Warren и Marshall описали налице спиралевидной бактерии в слизистой оболочке желудка больных активным хроническим гастритом. Взятие биопсийного материала проводится из мест с максимальной выраженной гиперемией и отеком. Взятие материала из дна и краев язв и эрозий является ошибочным, так как в них нет эпителиальных клеток, необходимых для адгезии и колонизации микроорганизма. Для повышения чувствительности метода биоптаты рекомендуется брать из разных частей желудка [20] (таб. 2).

Таблица № 2

Количество биопсийных образцов для диагностики НР

Вид исследования	Количество биоптатов
Первичное исследование	Антральный отдел вдоль большой кривизны - 2 Средняя часть желудка - 1
Контроль лечения	Антральный отдел вдоль большой кривизны - 1 Средняя часть желудка - 2

Исследование биоптатов проводится с использованием различных окрасок (акридиновым оранжевым, красителем Гимзы, серебрением по Вартину-Старри). Данная методика позволяет не только с высокой степенью надежности выявить наличие *Helicobacter pylori*, но и количественно определить степень обсеменения и морфологические изменения слизистой оболочки желудка, связанные с инвазией микроба (признаки воспаления, атрофия, метаплазия, дисплазия). Степень обсемененности слизистой оболочки желудка инфекцией *Helicobacter pylori* оценивается методом световой микроскопии по критериям Аруин Л.И. с соавт. (1993) [2], согласно которым выделяют три степени обсемененности слизистой оболочки:

-слабая (+) - до 20 микробных тел в поле зрения (при х 630);

- средняя (++) - 20-50 микробных тел в поле зрения;
- высокая (+++) - более 50 микробных тел в поле зрения.

К преимуществам этого метода диагностики относятся удобство хранения и транспортировки образцов, возможность проведения ретроспективного анализа, проведения оценки взаимосвязи между степенью обсемененности *H. pylori* и состоянием слизистой оболочки желудка. Недостатками метода являются длительное приготовление парафиновых срезов, некоторая субъективность в определении степени изменения слизистой оболочки желудка, невозможность дифференцировать виды *Helicobacter* и тем более их генотип, возможность получения ложно-негативных результатов в связи с неправильным забором гастробиопсийного материала (биопсия только из антрального отдела желудка, скудные биоптаты, не содержащие эпителия и слизи), а также наличие участков кишечной метаплазии, погрешностей окраски [7].

2) *Цитологический метод исследования Helicobacter pylori* основан на изучении мазков - отпечатков биоптатов, полученных при эндоскопии из участков слизистой оболочки желудка или двенадцатиперстной кишки с наиболее выраженными морфологическими изменениями, что позволяет существенно уменьшить время получения результатов анализа [28]. Микроскопия окрашенных мазков-отпечатков позволяет выявить наличие НР и оценить степень обсемененности:

- слабая (+) - до 20 микробных тел в поле зрения (при х 630);
- средняя (++) - 20-50 микробных тел в поле зрения;
- высокая (+++) - более 50 микробных тел в поле зрения.

В зависимости от способа получения материала выделяют различные варианты данной методики: раз давливание биоптата (crash cytology), прикосновение и отпечаток люминальной поверхности биоптата к предметному стеклу (imprint или touch cytology), получение пристеночной слизи (brush cytology). Мазки высушивают и окрашивают по Романовскому-Гимзе, по Папенгейму или после фиксации метанолазуро-эозиновой смесью. Цитологическое исследование позволяет также выявить наличие пролиферативных процессов, неоплазии, метаплазии, дисплазии, оценить степень их выраженности. Однако ввиду низкой чувствительности данной методики (18-20%) данный метод не применяется в странах дальнего зарубежья. Несмотря на существенные ограничения в диагностике *Helicobacter pylori*, данная методика в нашей стране играет не последнюю роль. Для повышения его диагностической значимости проводилось сопоставление цитологических препаратов, приготовленных разными способами. Было показано, что brush-способ является наиболее приемлемым. Не обходимо также учитывать, что исследование с не скольких точек повышает диагностическую надежность методики. Сарсенбаева А.С., Игнатова Г.Л., Воротникова С.В. предлагают исследовать не менее 4 участков из обоих отделов желудка [20]. В результате сравнительной оценки различных способов окраски пришли к выводу о целесообразности использования двух методик: окраску мазков слизи по Граму и 0,05% р-ром акридинового оранжевого. Второй способ ограничивается наличием люминесцентного микроскопа и кокковой формой бактерии. Способ окраски по Граму по всем параметрам (простота, специфичность, надежность, доступность реактивов, стоимость) оказался наилучшим. Сарсенбаева А.С., Игнатова Г.Л., Воротникова С.В. предложили для оптимизации цитологического метода исследования свою модификацию окраски по Граму. Если обычно используется 1% р-р генциан- или кристаллвиолета, то в данной модификации р-р должен быть 0,1% и окрашивание проводится не 1 мин, а 20-30 с. После каждого красителя обязательно нужно ополаскивать препарат проточной водой и осушать фильтровальной бумагой или марлевым тампоном. Ряд авторов указывает на то, что диагностическая чувствительность цитологического метода может достигать 80-90%, а специфичность - 100% [6, 13]. Предложенные способы выявления НР цитологическим методом в желудочном соке, полученном натощак [4], имеют низкую чувствительность и специфичность, поэтому в настоящее время не применяются.

Быстрый уреазный тест - оценка местной уреазной активности. По современным представлениям, быстрый уреазный тест вместе с морфологическим методом является стандартом для диагностики инфекции БР в желудке [8]. Методика предполагает забор прижизненных биопсийных образцов тканей в ходе выполнения эзофагогастродуоденоскопии. В основу определения уровня желудочной уреазной активности положен специфический механизм жизнедеятельности бактерии *Helicobacter pylori* - расщепление мочевины, находящейся в содержимом желудка, ферментом уреазой. В результате реакции образуется аммиак и углекислый газ. Кислотно-щелочной баланс желудка (рН среды) сдвигается в щелочную сторону, что фиксируется с помощью индикатора (рис. 1).

Выделение уреазы

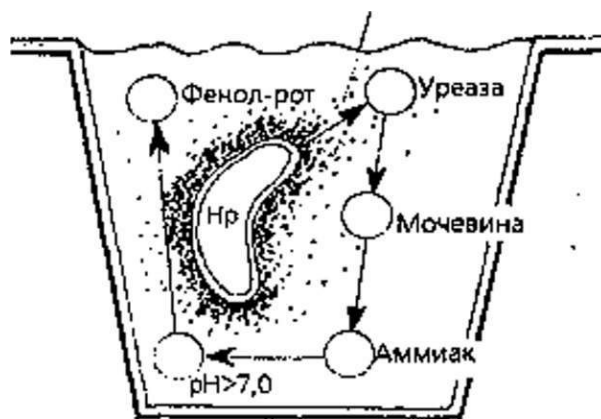


Рис. 1. Схема проведения уреазного теста.

Полученный биопатат помещается в специальную ячейку с готовыми растворами. Быстрота изменения окраски индикатора с желтого на ярко-красный зависит от уреазной активности, которая, в свою очередь, зависит от количества бактерий. При малом количестве бактерий изменение окраски в уреазном тесте может произойти через несколько часов. Время появления малинового тона косвенно указывает на количество микроорганизмов:

- малиновое окрашивание к концу суток - (+) незначительная инфицированность;
- малиновое окрашивание появляется в течение 2 часов - (++) умеренная инфицированность;
- малиновое окрашивание появляется в течение первого часа - (+++) значительная инфицированность;
- малиновое окрашивание не наступает - (-) отрицательный результат.

В настоящее время выпускаются уреазные тесты промышленного производства: «CLO-тест», «Де-Нол-тест», «PyloriTek», «CUT-тест», «ХЕЛПИЛ-тест», «Campy-test» и др. Чувствительность указанных тестов колеблется от 65 до 95%, специфичность - от 75 до 100%. В России часто используется уреазный тест, приготовленный непосредственно в лаборатории. Этот тест экономичен, надежен, прост в использовании. В российских «Рекомендациях по диагностике и лечению инфекции, вызванной *Helicobacter pylori*, у взрослых при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки» [17] приведена пропись уреазного теста: 2 г мочевины, 10 мл фенолрота (0,5%), 20 мг азидата натрия доводят до 100 мл 0,001 М фосфатным буфером, pH 5,5. Сарсенбаева А.С., Игнатова Г.Л., Воронникова С.В. [20] предложили следующий состав реагентов: мочевины - 2 г, феноловый красный 0,5% - 10 г, 20 мг азидата натрия, 0,01 М фосфатный буфер, pH 6,5 - 100 мл. Готовят по обычной рецептуре: 0,001 М фосфатный буфер pH 5,5 разливают по флаконам, стерилизуют при +121°C 15 мин. К охлажденному буферу добавляют мочевины - 2 г, раствор фенолового красного и азидата натрия (обладающий свойствами консерванта). Цвет реактива должен быть желто-розовым. При подкислении реактива его цвет меняется на соломенно-желтый, при подщелачивании - на малиновый. Приготовленный реактив должен быть соломенно-желтого цвета и может длительно храниться в темной упаковке при температуре +2°C-+6°C. Процедура выполнения теста (с 2% мочевиной): поместить 2 капли реагента в пробирку типа эппендорф, поместить биопсийный материал в первую пробирку, вторая пробирка используется в качестве контрольной, микропробирку инкубируют при температуре 37°C, учитывать результат через 20 мин, 1 ч, 3 ч, 24 ч (таб. 3).

Таблица № 3 Учет результатов и показатели изменения времени окраски реагента

	Время учета			
	20 мин	1 ч	3 ч	24 ч
% положительных результатов	75	85	90	95

Последующие модификации быстрого уреазного теста дали возможность получения более быстрого результата. При использовании незабуферного раствора мочевины положительный результат регистрируют в течение 1 мин у 90% больных хеликобактериозом, подтвержденным бактериологически. Однако этот метод может давать положительные результаты, если результат оценивается позже 1 минуты. В связи с этим было предложено использовать 6% раствор мочевины. В этом случае результаты теста учитываются в течение 15 мин. Основное значение метода - первичная диагностика наличия *Helicobacter pylori* у пациентов. Чувствительность и специфичность данного метода составляет 98-99% [16]. Преимущество данного метода состоит в том, что он позволяет получить заключение быстро - от нескольких минут до нескольких часов, его использование не предполагает наличие специального лабораторного оборудования или подготовленных специалистов и выполняется непосредственно эндоскопистом, экономичен при массовом и индивидуальном применении. В настоящее время разработано большое количество промышленно изготовленных уреазных тестов. К недостаткам теста относится его инвазивность, получение ложноотрицательных (при малом количестве микробных тел) или ложноположительных результатов (контаминирование материала другими

уреазопродуцентами, формами, имеющими близкое родство с НР — (*H. heilmanii*), или при появлении кокковых форм НР, не проявляющих ферментативной уреазной активности), а также не возможность оценить состояние слизистой оболочки желудка. Предложение ряда исследователей [15, 18, 30] определять уреазную активность в желудочном соке не нашло применения в клинической практике. Уреазный тест в микроампулах предложен В.Е. Ми-лейко, Т.М. Григорян. В качестве тест-системы для инвазивной биохимической диагностики хеликобак-териоза предлагается герметически запаиваемая ампула, которая содержит 0,05-0,5 мл реакционного р-ра:

-0,05-0,4 мг/л индикатора с цветовым переходом в области значений pH от 6,0 до 9,0 - феноловый красный или бромтимоловый синий, нейтральный красный, бромкрезоловый синий;

-дигидрофосфат натрия, гидрофосфат калия (суммарно от 1,5 до 3,0 г/л);

-хлорид аммония, хлорид натрия (калия) от 0,01 до 0,05 г/л суммарно;

-дополнительно можно для увеличения срока хранения - гидроокись серебра.

Для проведения анализа в ампулу помещают биоптат и фиксируют время появления малиновой окраски. Контрольное время составляет 15 мин, 3 ч и 24 ч. Отсутствие изменений цвета более чем за 24 часа свидетельствует об отсутствии НР.

Фазово-контрастная микроскопия - весьма удобный метод обнаружения НР при условии достаточной высокой степени обсемененности: нет необходимости проводить фиксацию материала и его окраску, результат может быть получен через 1-2 мин. При проведении исследования биоптат помещается на предметное стекло, измельчается и проводится микроскопия с помощью фазово-контрастного микроскопа с увеличением в 100 раз с использованием иммерсионного масла. В препарате - типичные изогнутые бактерии в хаотичном движении.

Иммуногистохимический метод. Биопсийный материал, фиксированный в формалине и залитый в парафин, обрабатывается моноклональными антителами против НР. Готовые к применению коммерческие наборы с моноклональными антителами работают при разведении 1:200000 и избирательно окрашивают только НР. Этот метод диагностики зарекомендовал себя при низкой степени обсемененности и выявления морфологически измененных кокковых форм микроорганизма.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). ПЦР (относится к молекулярно-биологическим методам) представляет собой многократное увеличение числа копий (амплификация) специфического участка ДНК, катализируемое ферментом ДНК-полимеразой. Метод ПЦР в средах позволяет идентифицировать НР без выделения чистой культуры по присутствующим в исследуемом материале фрагментам его генома. Метод предназначен для качественного обнаружения ДНК НР в биологических образцах (биоптаты слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки, десен, мазки из зубодесневых карманов, слюна). Позволяет оценить генотипические и фенотипические характеристики возбудителя. Почти у каждого пациента имеется уникальный штамм НР. Выявлено, что вирулентность НР во многом обуславливает клинические проявления инфекции. Существует ряд генов, продукты которых - белки Cag A, Vac A, Ice A, Bab A - считают факторами патогенности. В зависимости от их наличия выделяют два типа штаммов НР. Экспрессирующие Cag A-, Vac A-токсин относят к первому типу, штаммы второго типа не экспрессируют указанные гены и считают менее патогенными. Различают электрофоретические методы детекции ПЦР-амплифицированной ДНК и методы ДНК-гибридизации. Электрофоретический метод детекции продуктов амплификации самый простой в исполнении, но является в настоящее время устаревшим ввиду невозможности автоматизации и трудности количественной оценки [11]. Среди большого разнообразия гибридационных методов анализа ДНК метод ПЦР наиболее широко используется в клинической лабораторной диагностике. Регистрирование гибридации осуществляется микропланшетным флуориметром, а оценка результата проводится автоматически специальной компьютерной программой. В настоящее время эта методика широко используется в практическом здравоохранении, службе государственного надзора и для научных исследований. Научно-производственной фирмой «Литех» при НИИ физико-химической медицины МЗ РФ выпускаются наборы реагентов для определения ДНК НР в биопсийном материале: «Хеликопол», «Платан» и др.

Неинвазивные методики

Дыхательные тесты

1) *Уреазный дыхательный тест.* На уреазной активности НР основаны радионуклидные методы диагностики инфекции (неинвазивные и косвенные) - это уреазные дыхательные тесты с меченой мочевиной, меченой изотопами ^{13}C и ^{14}C [23]. В 1987 г. D. Graham и соавт. [27] опубликовали данные о первом методе с использованием меченой ^{13}C мочевины для определения *Campylobacter pylori* в СОЖ. Меченая мочевина дается пациенту в составе пробного завтрака. Уреаза НР разлагает мочевину до углекислого газа, сохраняющего меченый углерод. Углекислый газ с кровотоком доставляется в легкие и выводится с выдыхаемым воздухом. Пациент делает выдох в специальную пробирку-контейнер, и пробу воздуха направляют на анализ. ^{14}C -радиоактивный изотоп, который является источником низкоэнергетических бета-частиц. Его использование имеет ряд ограничений и подчиняется строгому контролю, поэтому данный вариант менее распространен. Для регистрации приращения $^{14}\text{CO}_2$ в выдыхаемом воздухе используют сцинтилляционный счетчик. Изотоп ^{13}C нерадиоактивен, может быть количественно определен с помощью газового масс-спектрометра или инфракрасного либо лазерного оборудования. Масс-спектрометры

применяются наиболее широко. Поскольку для дыхательного теста не требуется проведение эзофагогастроскопии, этот метод применим у пациентов, которым она противопоказана. Дыхательный тест с изотопом ^{13}C может быть использован для обследования детей, при эпидемиологических исследованиях больших контингентов населения. Этот тест дает представление обо всей СОЖ, а не об отдельном ее фрагменте. Его чувствительность достигает 99%, а специфичность - 98% [10, 16, 29]. В начале исследования берутся 2 фоновые пробы выдыхаемого воздуха. Далее пациент съедает легкий завтрак и тестовый субстрат (водный р-р мочевины, меченой ^{13}C) в течение 1 часа, с интервалами в 15 минут, у него берут 4 пробы выдыхаемого воздуха. Уровень радиоактивного изотопа в выдыхаемом воздухе определяют в течение 10-30 минут. Затем пробы направляются на масс-спектрометрию. Выражается как приращение $^{13}\text{CO}_2$ - $^{13}\text{CO}_2$ его экскреция (‰) и считается положительной при значениях выше 5‰ [5]. В ряде стран используется определение изотопного отношения концентраций $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$, что позволяет свести к минимуму влияние на конечный результат методических и инструментальных погрешностей. При использовании дыхательного уреазного теста ложноположительные результаты встречаются редкими (4-10%). Ротовая полость и глотка могут быть колонизированы уреазпродуцирующими бактериями, что и обуславливает ошибочный от вет теста. Ложноотрицательные результаты возможны у пациентов, принимавших перед исследованием антисекреторные и висмутсодержащие препараты, которые ингибируют уреазу бактерий, в связи с чем рекомендуется осуществлять диагностику эрадикации уреазными методами не ранее чем через месяц после приема этих препаратов. Противопоказаниями для уреазного дыхательного теста являются кровотокащие язвы, атрофический гастрит, MALT-лимфомы. Метод быстрый, удобный, но ограничен в распространении из-за необходимости использовать дорогостоящее оборудование и изотопные препараты. Поскольку уменьшение стоимости изотопа невозможно, были предложены варианты масс-спектрометров на основе лазерного и инфракрасного излучения, стоимость которых существенно ниже. С другой стороны, использование микрокапсул для упаковки мочевины, меченой радиоактивным изотопом, позволило свести к минимуму трудности, связанные с хранением, утилизацией и безопасностью данного изотопа. В США продажа микрокапсул с мочевиной, меченой углеродом, разрешена FDA наравне с обычными лекарственными препаратами через аптечную сеть, что является свидетельством полной безопасности данного изотопа для обследуемых и окружающей среды. Появление такой формы меченой мочевины существенно повышает конкурентоспособность этой методики, т.к. стоимость и самого изотопа, и оборудования для его проведения в среднем меньше в 10 раз, чем масс-спектрометра.

2) *Аммиачный дыхательный тест*. В Санкт-Петербурге разработан неинвазивный метод «Хелик-тест». Образующийся аммиак измеряют линейно-колористическим методом в воздушной среде ротовой полости пациента. Набор для проведения теста состоит из одноразовой трубки и прибора - ирриго-аспиратора. Индикаторная трубка ИТМ-12 - стекло-дроссель, заполненный индикаторным составом (на мелкодисперсный силикогель нанесен бромфеноловый синий совместно с серной кислотой), при прохождении через него воздуха, содержащего аммиак, цвет индикатора меняется на фиолетовый. Воздух в объеме 2 литров в течение 10 мин просасывается через вскрытую трубку, а затем определяется концентрация аммиака в мг/м³ по шкале учета величины окрашенного столбика. Пороговой концентрацией аммиака, диагностически значимой для НР-инфицирования, считается 0,4 мг/м³ и прирост после нагрузки карбамидом 500 мг в 10 мл воды - 0,2 и более. Уровень аммиака может зависеть от азотистого обмена у пациента, функционального состояния печени, активности других уреазпродуцентов ЖКТ. По сравнению с зарубежными углеродными тестами, Хелик-тест, обладая столь же высокой чувствительностью, требует значительно меньшего времени исследования (20 мин), имеет несравнимо меньшую стоимость, не нуждается в приеме изотопов измененного состава и позволяет получить результат непосредственно в ходе исследования. Хелик-тест может быть использован как для первичной диагностики НР и скрининга, так и для динамического наблюдения за больными и оценки эффективности терапии.

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). Неоднократные попытки разработки неинвазивного метода диагностики НР на основе метода ПЦР увенчались успехом. На базе научной лаборатории НПФ «ЛИИ-ТЕХ» был разработан *тест для диагностики хелико-бактерной инфекции в кале*. Чувствительность данного метода составила 61-93,7%, специфичность - 100% [10]. Преимущество данной методики состоит в неинвазивности, простоте и скорости выполнения (на постановку 30 исследований необходимо 4,5-5 часов), относительно низкой себестоимости по сравнению с ИФА и возможности использования не только для первичной диагностики, но и для эпидемиологических исследований. Недостатки связаны со снижением чувствительности методики у взрослых в связи с более длительным пассажем каловых масс по кишечнику и разрушением ДНК НР, а также низкой специфичностью теста на ранних этапах после проведенной антихеликобактерной терапии.

ИФА - метод диагностики НР-инфекции, самый подходящий метод для эпидемиологических исследований и скрининга. Через 3-4 недели после инфицирования хеликобактериями слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки в крови больных появляются антитела к хеликобактериям. Эти антитела определяются путем иммуноферментного анализа. Выявляют антитела IgG, IgA, IgM-классов в крови и секреторные sIgA, sIgM в слюне и желудочном соке. Поскольку инфекция является хронической, то положительные серологические тесты указывают на наличие текущей инфекции. Несмотря на то, что уровень антител в процессе успешной эрадикации падает, серологическая реакция остается положительной в течение ряда лет. Это ограничивает возможности исследования крови для оценки эффективности лечения или для

диагностики наличия у больного НР. Однако быстрое падение уровня анти тел косвенно может указывать на санацию слизистой оболочки желудка. Имеется несколько модификаций этого теста: ELISA (ферментный иммуносорбент- ный метод), реакции фиксации комплемента, бактериальной и пассивной гемагглютинации. Классический иммуноферментный анализ с количественным определением в сыворотке или плазме крови больших антихеликобактерных антител разных классов характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью, в пользу чего свидетельствуют сравнительные исследования наборов для проведения таких анализов, выпускаемых различными производителями. Преимуществом метода ИФА является меньшая травматичность по сравнению со всеми другими методами, где нужно получение биоптата слизистой оболочки желудка. Кроме того, для анализа требуется несколько микролитров сыворотки, в оборудованной лаборатории можно одновременно выполнить десятки исследований и получить результаты в короткие сроки (2,5-3 ч). Данный метод идеален для первичной диагностики, так как при высокой чувствительности и специфичности (более 90% по сравнению с инвазивными методами, включая ПЦР) он на сегодняшний день самый дешевый. Увеличение чувствительности и специфичности метода, вследствие совершенствования технологии, позволило применить его для диагностики эрадикации через 3 месяца [20], а по результатам некоторых исследований - через 1,5-2 месяца [5]. Использование же высокочувствительных наборов, в основу которых положен непрямой ИФА с применением антигена *H. pylori*, меченого биотином (набор для ИФА «HELICONS-AB IgG» (Италия)), позволяет зафиксировать снижение концентрации специфических антител уже через 30-40 дней после окончания успешного лечения [20] и таким образом укладывается в сроки оценки эрадикации, принятые для инвазивных методов и дыхательного теста. Без условной сенсации 1998 года явилось появление на рынке теста для *количественного определения антигена НР в фекалиях больных с помощью ИФА*. Этот высокочувствительный и специфичный тест может применяться как при первичной диагностике хелико-бактерной инфекции, так и для контроля лечения, а также прогнозирования эффективности антихелико-бактерной терапии. Однако применение в клинической практике данного метода ограничено его высокой стоимостью по сравнению с другими методиками диагностики хеликобактериоза.

Иммуноблотинг существенно уступает другим иммунологическим методам как по стоимости, так и по трудоемкости выполнения анализа, однако только с его помощью можно, имея лишь сыворотку крови больного, получить данные о свойствах штамма НР - продуцирует ли он CagA и VacA.

Сухой уреазный тест, аналог «Хелпил-теста», был предложен В.Е. Милейко и Т.М. Григорян [14]. Тест на твердом пористом носителе выполнен в виде бумаги, разрезанной на тест-билеты, которые содержат карбамид и индикатор бромтимоловый синий. Для оценки уреазной активности тест-билет смачивают слюной и в течение 3 минут регистрируют по явление индикационного эффекта - синего пятна на желтом фоне. О степени уреазной активности свидетельствуют скорость появления пятна, диаметр и интенсивность окраски. Окрашивание теста вокруг смоченного участка шириной до 1 мм расценивается как 1-я степень, 1-2 мм - 2 степень, более 2 мм - 3 степень уреазной активности. Время проведения теста 3-5 минут. У курящих тест на основе чувствительных рН-индикаторов при смачивании слюной окрашивается в результате высокой щелочности слюны в 95% случаев и не позволяет судить об уреазной активности слюны в требуемом интервале рН. Таким образом, данный тест может ограниченно использоваться для оценки уреазной активности слюны с целью диагностики хеликобактерной инфекции.

Заключение

В соответствии с российскими стандартами для диагностики хеликобактериоза необходимо использовать одновременно не менее 2 тестов. Это обусловлено тем, что практически ни один из применяемых методов не обладает 100% чувствительностью. В научных целях проводятся сравнение 3-4 методов, основанных на различных эффектах. Серьезность заболеваний, вызываемых хеликобактериями, ставит на повестку дня необходимость поиска эффективных, рациональных, неинвазивных, экономичных методов выявления инфицирования НР. Само по себе выявление *Helicobacter pylori* в слизистой оболочке не всегда свидетельствует о наличии заболеваний желудка или двенадцатиперстной кишки, ассоциированных с этим инфекционным агентом. Обсеменение слизистой оболочки может встречаться и у совершенно здоровых людей, генетически невосприимчивых к *Helicobacter pylori*, у которых бактерия не способна к адгезии на эпителии. Значение имеют случаи сочетания инфицирования *Helicobacter pylori* и характерных эндоскопических признаков хронического антрального гастрита, пангастрита, хронического активного дуоденита, язвенной болезни желудка и язвенной болезни двенадцатиперстной кишки.

Список литературы

- 1.Авалуева Е.Б., Ткаченко Е.И. Язвенная болезнь (краткое изложение состояния проблемы на современном этапе) // Terra Medica. 2007. № 4. С. 3-9.
- 2.Хронический гастрит / Л.И. Аруин [и др.]. Амстердам, 1993. 362 с.
- 3.Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. М.: Трида-Х, 1998. 496 с.
- 4.Баженов Л.Г., Ходжаева Н.У, Садыков Р.А., Саидханов Б.А. // Клиническая лабораторная диагностика. 1993. № 5. С. 19-22.
- 5.Барышникова Н.В. Актуальные проблемы диагностики хеликобактериоза // Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2009. № 2. С. 50.

- 6.Гребенев А.Л., Лапина Т.Л., Склянская С.А. и др. // Клиническая лабораторная диагностика. 1995. № 6. С. 104-105.
- 7.Ильчишина Т.А. Особенности лабораторной диагностики *Helicobacter pylori* и клинического течения хронического гастрита и язвенной болезни при бациллярно-кокковом дисморфизме бактерии // Дис... канд. мед. наук: 14.00.46, 14.00.47. СПб., 2008. 136 с.
- 8.Исаков В.А., Домарадский И.В. Хеликобактериоз. М.: ИД Медпрактика-М, 2003. 412 с.
- 9.Калинин А.В. Хронический гастрит. В кн.: Гастро-энтерология и гепатология: диагностика и лечение / Под ред. А.В. Калинина и А.И. Хазанова. М.: Миклош, 2007. 59-69 с.
- 10.Кишкун А.А. Современные методы диагностики и оценки эффективности лечения инфекции, вызванной *Helicobacter pylori* // Клиническая лабораторная диагностика. 2002. № 8. С. 41-46.
- 11.*Helicobacter pylori* - инфекция: современные аспекты диагностики и терапии. Пособие для врачей / Л.В. Кудрявцева [и др.]. - М., 2004.
- 12.Леонтьева Н.И. [и др.]. Оценка инвазивных и не-инвазивных методов диагностики хеликобактерной инфекции // Современные технологии в медицине. 2011. № 2. С. 57-60.
- 13.Логинов А.С., Аруин Л.И., Ильченко А.А. Язвенная болезнь и *Helicobacter pylori*. Новые аспекты патогенетической терапии. М., 1993. 230 с.
- 14.Методы диагностики хеликобактериоза: учебное пособие / под ред. А.В. Козлова, В.П. Новиковой. СПб.: Издательство «Диалект», 2008. 88 с.: ил.
- 15.Москвич Ц.Г., Соколовский В.В., Пак С.Ф. // Клиническая медицина. 1989. Т. 67. № 1. С. 80-81.
- 16.Практическое руководство Всемирной организации гастроэнтерологов (ВОГ/OMGE) *Helicobacter Pylori* в развивающихся странах / R.H. Hunt, S.D. Xiao, F. Megraud, R. Leon-Barua, F. Bazzoli, S. van der Merwe and other [Электронный ресурс]. URL: <http://www.omge.org/assets/downloads/ru/pdf/guidelines/gdata15ru.pdf>.
- 17.Рекомендации по диагностике и лечению инфекции *Helicobacter pylori* у взрослых при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки // Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии. 1998. № 1. С. 105-107.
- 18.Рожавин М.А., Сологуб В.В., Микитюк И.Б. // Журнал микробиологии. 1989. № 1. С. 111-112.
- 19.Ройтберг Г.Е., Струтынский А.В. Внутренние болезни. Система органов пищеварения. М: МЕДпресс-информ, 2007. 560 с.: ил.
- 20.Сарсенбаева А.С. Методы диагностики инфекции *Helicobacter pylori*: Учебное пособие / А.С. Сарсенбаева, Г. Л. Игнатова, С.В. Воротникова. Челябинск, 2005. 50 с.
- 21.Циммерман Я.С. Клиническая гастроэнтерология: избранные разделы. М: ГЭОТАР-Медиа, 2009. 416 с.: ил.
- 22.Чернин В.В. Болезни пищевода, желудка и двенадцатиперстной кишки. М: ООО «Медицинское информационное агентство», 2010. 528 с.
- 23.Atherton J.C. // Aliment. Pharmacol. Ther. 1997. Vol. 11. Suppl. I. P. 11-20.
- 24.Bermejo San Jose F., Boixeda de Miguel D., Gisbert J. et al. Efficacy of four widely used techniques of the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in gastric ulcer disease // Rev. Clin. Esp. 2000. Vol. 200. P. 475-479.
- 25.Fallahi G.H., Maleknejad S. *Helicobacter pylori* culture and antimicrobial resistance in Iran // Indian J. Pediatr. 2007. Vol. 74. № 2. P. 127-130.
- 26.Glupczynski Y. // Acta Gastroenterol. Belg. 1998. Vol. 61. P. 321-326.
- 27.Graham D.Y., Klein P.D., Evans D.J. et al. // Lancet. 1987. Vol. 1. № 8543. P. 1174-1177.
- 28.Hirschi A.M., Makristathis A. Methods to detect *Helicobacter pylori*: from culture to molecular biology // *Helicobacter*. 2007. Vol. 12. suppl. 2. P. 6-11.
- 29.Logan R.P.H. // *Helicobacter pylori* and Gastro- duodenal Disease / Eds B.J. Rathbone, V.R. Heartley. 2-nd Ed. - Oxford. 1992. P. 88-107.
- 30.Marshall B.J. // Hosp. Pract. 1987. Vol. 22. № 8. P. 87-96.
- 31.Pellicano R., Smedile A., Ponzetto A. et al. How accurate is the culture of *Helicobacter pylori* in a clinical setting? // An appraisal. Panminerva Med. 2005. Vol. 47. № 3. P. 191-194.

Сведения об авторах

Шамсутдинова Рушанья Агзамовна - Кировская ГМА, кафедра пропедевтики внутренних болезней и профессиональных болезней, ассистент; раб. тел.: 23-25-47, e-mail: shamrusham@mail.ru;

Чепурных Асия Ярулловна - Кировская ГМА, кафедра пропедевтики внутренних болезней и профессиональных болезней, к.м.н., зав. кафедрой;

Савиных Елена Александровна - Кировская ГМА, кафедра пропедевтики внутренних болезней и профессиональных болезней, к.м.н., доцент;

Коновалова Надежда Валентиновна - Кировская ГМА, кафедра пропедевтики внутренних болезней и профессиональных болезней, ассистент; раб. тел.: 23-25-47;

Бикметова Анна Владимировна - Кировская ГМА, кафедра пропедевтики внутренних болезней и профессиональных болезней, ассистент; раб. тел.: 23-25-47.