

© СУХАНОВ А.В., ПИКЕРСКИЙ И.Э., ИГНАТОВ А.В., СЕРЕБРЕННИКОВА Е.Н., МЕНЬШИКОВА Л.В. — 2007

ИНФОРМАТИВНОСТЬ ДЫХАТЕЛЬНОГО УРЕАЗНОГО ХЕЛИК®-ТЕСТА В ОПРЕДЕЛЕНИИ СТЕПЕНИ ОБСЕМЕНЁННОСТИ *HELICOBACTER PYLORI* И ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ СЛИЗИСТОЙ ОБОЛОЧКИ ЖЕЛУДКА. СООБЩЕНИЕ 6. СРАВНЕНИЕ С МОЛЕКУЛЯРНЫМ МЕТОДОМ

А.В. Суханов, И.Э. Пикерский, А.В. Игнатов, Е.Н. Серебренникова, Л.В. Меньшикова

(Иркутский областной клинический консультативно-диагностический центр, гл. врач — к.м.н. М.Л. Меньшиков; Иркутский государственный университет, ректор — д.х.н., проф. А.И. Смирнов; Институт географии СО РАН, директор — д.г.н. А.Н. Антипов; Иркутский государственный институт усовершенствования врачей, ректор — д.м.н., проф. А.А. Дзининский, кафедра семейной медицины, зав. — д.м.н., проф. Л.В. Меньшикова)

Резюме. Проведено сравнительное исследование результатов уреазного дыхательного Хелик®-теста и определения ДНК *H. pylori* в слизистой оболочке желудка у 50 пациентов с использованием двух статистических методов: корреляционного и регрессионного анализов. Совпадений показателей не получено ни при проведении корреляционного, ни при использовании регрессионного статистических методов. Делается вывод о низкой диагностической ценности дыхательного уреазного Хелик®-теста по методике фирмы АМА.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, дыхательный уреазный Хелик®-тест, ПЦР диагностика.

Известно, что наиболее частой причиной возникновения гастритов и язвенной болезни является микроорганизм *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) — Природные резервуары этого возбудителя не выявлены, а вне организма *H. pylori* приобретает устойчивую кокковидную форму и реверсирует в вибрион только в желудке [8,9,12,13].

Для уточнения этиологии заболеваний желудка и двенадцатипёрстной кишки необходимо установить наличие этого возбудителя. С этой целью были разработаны различные методы выявления *H. pylori*, основанные на биохимических и морфологических особенностях этого микроорганизма.

Известно, что *H. pylori* обладает выраженной уреазной активностью. Бактериальная уреазы разлагает мочевины до углекислого газа и аммиака. Эта особенность метаболизма легла в основу разработки различных неинвазивных методов определения *H. pylori*, получивших название «уреазные тесты». Широкое распространение в большинстве стран мира получили уреазные дыхательные тесты с мочевиной, меченной изотопами углерода ^{13}C и ^{14}C [11]. Данный изотоп, входящий в состав мочевины, при разложении последней выделяется в составе углекислого газа через лёгкие с возможностью его последующей регистрации в выдыхаемом воздухе.

Существует и другой метод оценки уреазной активности *H. pylori* — регистрация аммиака, образующегося при гидролизе мочевины (Хелик®-тест) [5].

Дыхательные уреазные тесты имеют как положительные, так и отрицательные стороны. Основная ценность этих методов заключается

в том, что исследователь имеет представление об уреазной активности всей поверхности слизистой оболочки желудка (СОЖ), а не отдельных её фрагментов.

Недостаток уреазных тестов заключается в том, что эти методы косвенные, не позволяющие обнаружить возбудителя непосредственно [7].

Целью настоящего исследования является сравнительное изучение информативности дыхательного уреазного Хелик®-теста по методике фирмы АМА и определения ДНК *H. pylori* в биоптате СОЖ.

Материалы и методы

Исследование проводилось на базе Иркутского областного клинического консультативно-диагностического центра.

В исследование было включено 50 пациентов, обратившихся в ИОККДЦ с различными диспептическими жалобами. Всем обследуемым проводился общеклинический осмотр, эндоскопическое исследование с забором биоптатов СОЖ для выявления нуклеиновых кислот возбудителя с помощью метода ПЦР и уреазный дыхательный Хелик®-тест с использованием расходных материалов и оборудования фирмы АМА (г. Санкт-Петербург).

Возраст обследуемых пациентов варьировался от 13 до 75 лет и составлял в среднем 37 ± 8 лет. Основной диагноз, установленный в ходе эндоскопического и морфологического обследования, — хронический поверхностный гастрит, встречался у 48 (96%) пациентов, у остальных 2 (4%) — диагностирована язвенная болезнь двенадцатипёрстной кишки.

Всем испытуемым проводился дыхательный уреазный Хелик®-тест с использованием мочевины нормального изотопного состава. Методика данного исследования была следующей: у пациента в течение 5 минут с помощью микрокомпрессора забирался воздух ротовой полости и проходил через капилляр, содержащий индикатор, нанесённый на силикагель. Затем внутрь давался раствор, содержащий 0,5 г мочевины нормального изотопного состава в 15 мл воды. После 5-ти минутной экспозиции повторялся забор воздуха из ротовой полости. При наличии в последнем аммиака, индикатор менял цвет с жёлтого на тёмно-синий. По величине изменения цвета, измеренной в миллиметрах, Хелик®-тест оценивался как отрицательный —

Таблица 1

Статистические характеристики изучаемых параметров

Переменная	Число измерений	Среднее значение	Стандартное отклонение
Уреазный тест	50	1,15	0,33
ПЦР ДНК <i>H. pylori</i>	50	0,7	0,46

если не было разницы между выраженностью окрашивания индикатора до и после приёма мочевины (0 баллов), слабоположительный — если разница составляла 1–2 мм (1 балл), положительный — при разнице 3–10 мм (2 балла) и резко положительный — при разнице более 10 мм (3 балла).

ПЦР-диагностика выдаёт только отрицательные или положительные результаты, которые выражались в баллах: 0 или 1 соответственно.

Методы исследования взаимосвязанности переменных
Для изучения взаимосвязанности контролируемых характеристик были применены методы корреляционного и регрессионного анализа. Вычисление коэффициентов корреляции, оценка их точности и статистической значимости

ти проводилась по стандартным формулам [3] с помощью программы «Excel» из пакета «Microsoft Office 2000».

Для оценки поведения условных средних (регрессий) их зависимость от своих аргументов аппроксимировалась кусочно-линейными кривыми. Для этого область изменчивости аргументов разбивалась на несколько равных интервалов, и в каждом из них вычислялись среднее значение аргумента и функции. Далее через точки, задаваемые такими средними значениями, проводились соответствующие ломаные линии. Все необходимые вычисления и построения графиков выполнялись с помощью программы, написанной одним из авторов настоящей статьи [2]. Числа, записываемые в месте положения вершин ломаных линий, аппроксимирующих регрессию, означают объем выборки, использованный для вычисления соответствующих условных средних. Статистически значимое изменение этих средних на области изменения их аргументов позволяет судить о наличии и приблизительной структуре регрессионной зависимости между соответствующими переменными.

Корреляционный анализ

Задачей корреляционного анализа является проверка гипотез о наличии взаимосвязей линейного характера между исследуемыми характеристиками. Для решения этой задачи были оценены коэффициенты корреляции между всеми переменными и их вариабельность.

Таблица 2

Коэффициент корреляции (выше диагонали) и его коэффициент вариации (ниже диагонали)

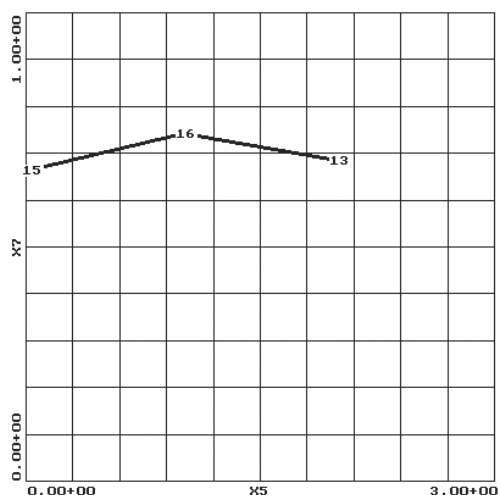
Наименования и обозначения переменных	X5	X7
Уреазный Хелик®-тест		0,09
ПЦР НР	158	

Между сравниваемыми показателями значимой корреляционной (линейной) связи не наблюдается: коэффициент корреляции $r = 0,09$ (табл. 2).

Коэффициент корреляции лишь частично, и из-за этого не всегда правильно, описывает взаимосвязанность переменных. Поэтому для подтверждения и уточнения выводов, сделанных на основе корреляционного анализа был проведен их взаимно-регрессионный анализ, задачей которого является проверка гипотез о наличии парных взаимозависимостей между оцениваемыми параметрами и взаимосвязей линейного характера между исследуемыми характеристиками.

Регрессионный анализ

Результаты регрессионного анализа парных взаимозависимостей между оцениваемыми параметрами в виде графика условных средних, построенных в соответствии с описанной выше методикой, показаны на рисунке 1.



Примечание: статистически достоверными считаются показатели, когда различия между начальными и конечными точками графика превышают две клетки по вертикали.

Рис. 1. Регрессионная зависимость результатов уреазного Хелик®-теста от данных обнаружения ДНК *H. pylori*.

Приведенные данные подтверждают вывод об отсутствии соответствия между уреазным Хелик®-тестом и результатами ПЦР диагностики ДНК *H. pylori* в биоптатах СОЖ, полученными как методами корреляции, так и вариационной статистики. Подобная демонстрация отсутствия связей нелинейного характера и корреляции указывает на низкую диагностическую информативность уреазного Хелик®-теста.

Результаты и обсуждение

Зависимость результатов уреазного теста от показателей обнаружения ДНК *H. pylori* в СОЖ не выявляется.

При проведении регрессионного анализа также выяснено, что нет никакой связи между выраженностью уреазного Хелик®-теста и данными молекулярной диагностики. В литературе мы не обнаружили развернутых и достаточно аргументированных работ по изучению Хелик®-теста независимыми исследователями, кроме патента и статей его авторов [4,5,6].

Почему уреазный Хелик®-тест с мочевиной нормального изотопного состава (по технологии АМА), в отличие от уреазных тестов с изотопно-обогащенной мочевиной, даёт показания биохимической активности *H. pylori*, которые не коррелируются с данными других методов диагностики *H. pylori*?

Как мы считаем, ответ необходимо искать в химизме протекающих процессов.

Известно, что в водной среде, под действием уреазы *H. pylori*, мочевина разлагается:



Когда уреазный тест проводится по общепринятой в мировой практике схеме с изотопно обогащенной мочевиной ^{13}C или ^{14}C , то степень обсемененности *H. pylori* определяется по количеству образовавшегося меченого CO_2 . Этот углекислый газ практически не вступает в химические реакции в организме и полностью выделяется через лёгкие, и таким образом фиксируется количественно, однозначно свидетельствуя об уреазной активности.

Уреазный Хелик®-тест, выполняемый по методике фирмы АМА, основан на определении количества выделившегося в желудке и попавшего в ротовую полость аммиака.

Во время проведения теста общее количество зафиксированного аммиака всегда значительно ниже «стехиометрически возможного». Поэтому возникает вопрос: что может влиять на степень выделения аммиака.

На наш взгляд существует не один, как утверждают авторы уреазного Хелик®-теста [5], а целый ряд факторов [10].

Во-первых, в желудке практически всегда имеется стехиометрически избыточное количество соляной кислоты, следовательно, обязательно должна иметь место реакция нейтрализации, протекающая с большой скоростью:



Во-вторых, необходимо учитывать, что аммиак, имеющий свободную электронную пару, способен кроме химического вступать и в донорно-акцепторные взаимодействия и образовывать различные соединения с органическими веществами, в избытке имеющимися в желудке в результате естественного слущивания клеток эпителия, выделения секрета многочисленными железами СОЖ.

Таким образом, дополнительно к предыдущему, мо-

гут иметь место следующие реакции с участием аммиака:

1. с карбонильными группами с образованием иминов или оснований Шиффа;
2. с карбоновыми кислотами с образованием аммонийных солей;
3. с аминокислотами с образованием аммонийных солей;
4. с липидами, с частичным гидролизом;
5. с фосфолипидами без гидролиза;
6. с фосфолипидами с частичным гидролизом;
7. с гидрохлорной кислотой (HClO), генерируемой нейтрофилами, с образованием цитотоксичных гидроксиаминов (NH_2OH) и монохлорамина (NH_2Cl) [1].

Учитывая вышесказанное, становится понятным, что на количество аммиака, выделяемого при уреазном Хелик®-тесте с мочевиной нормального изотопного состава, влияет гораздо большее число факторов, чем на регистрируемый углекислый газ при уреазном дыхательном тесте с изотопно обогащённой мочевиной.

Для того чтобы концентрации исходного аммиака и суммарно определённого были равны ($[\text{NH}_3]_{\text{исходной}} = [\text{NH}_3]_{\text{суммарно определённой}}$), необходимо создать в желудке, пищеводе и ротовой полости условия, сходные с химической колбой, где среда нейтральная, отсутствуют влага и любые органические соединения. Понятно, что подобия подобные условия *in vivo* невозможно, а, следовательно, дыхательный уреазный Хелик®-тест фирмы АМА не может быть рекомендован для определения степени обсеменённости СОЖ *H. pylori*.

Таким образом, методами математической статистики с использованием корреляционного и вариационного анализа показано что результаты уреазного Хелик®-теста по методике фирмы АМА не совпадают с результатами молекулярной диагностики ДНК *H. pylori* в биоптатах СОЖ. Дыхательный уреазный Хелик®-тест с фиксацией аммиака в воздухе ротовой полости не может быть рекомендован для диагностики хеликобактерной инфекции у человека.

INFORMATIVITY OF RESPIRATORY UREASE HELIC®-TEST IN DEFINITION OF DEGREE OF DISSEMINATION WITH HELICOBACTER PYLORI AND PATHOLOGICAL CHANGES IN STOMACH MUCOUS MEMBRANE: COMPARISON WITH THE MOLECULAR METHOD (REPORT 6)

A.V. Sukhanov, I.E. Pikersky, A.V. Ignatov, E.N. Serebrennikova, L.V. Menjshikova
(Irkutsk Regional Diagnostic Center; Irkutsk State University; Institute of Geography of Siberian Department of Russian Academy of Science; Irkutsk State Institute for Medical Advanced Studies)

There has been conducted the comparative investigation of the results of respiratory urease Helic®-test and definition of DNA of *H. pylori* in the stomach mucous membrane in 50 patients with the use of two statistical methods: correlational and regressive analyses. In conducting correlational and regressive statistical methods there have not been obtained any coincidences of indices. The conclusion has been made of a little diagnostic value of respiratory urease Helic®-test on the methods of AMA Firm.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. — М.: Трида-Х, 1998. — С.113-119.
2. Игнатов А.В. Опыт вероятностного моделирования и анализа взаимозависимости многомерных географических данных // География и природные ресурсы. — 1996. — № 4. — С.149-158.
3. Корн Г., Корн Т. Справочник по математике. — М.: Наука, 1978. — 831 с.
4. Корниенко Е.А., Дмитриенко М.А., Клочко О.Г. и др. Непрерывная регистрация концентрации аммиака в воздухе ротовой полости в диагностике инфекции *Helicobacter pylori* // Рос. журнал гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол. — 2003. — Т.ХІІІ, № 5, Приложение № 21. — С.159.
5. Корниенко Е.А., Милейко В.Е. Способ неинвазивной диагностики хеликобактера *in vivo*, RU 2100010 С1.
6. Корсунский А.А., Щербаков П.Л., Исаков В.А. Оценка информативности и рациональный выбор методов выявления *Helicobacter pylori* при хронических болезнях органов пищеварения у детей // В кн. Хеликобактериоз и болезни органов пищеварения у детей. — М.: ИД Медпрактика-М, 2002. — Глава 5. — С.105-124.
7. Лапина Т.Л. Основные принципы диагностики *H. pylori* // *Helicobacter pylori*: революция в гастроэнтерологии / Под ред. В.Т. Ивашкина, Ф. Мерго, Т.Л. Лапиной. — М.: Трида-Х, 1999. — С.107-116.
8. Логинов А.С., Васильев Ю.В., Касьяненко В.И., Зеленикин С.А. Уреазные тесты быстрого определения хеликобактер пилори в биоптате слизистой оболочки желудка как один из методов контроля результатов лечения больных язвенной болезнью // Рос. гастроэнтеролог. журнал. — 1997. — № 1. — С.19-23.
9. Логинов А.С., Васильев Ю.В., Сиваш Э.С., Фарбер А.В. Диагностика и лечение пенетрирующих язв желудка и двенадцатипёрстной кишки // Рос. гастроэнтеролог. журнал. — 1996. — № 3. — С.20-29.
10. Тюкавкина Н.А., Бауков Ю.И. Биоорганическая химия: Учебник. — 2-е изд., перераб. и доп. — М.: Медицина, 1991. — 528 с.
11. Atherton J.C. Non-endoscopic test in the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection // Aliment. Pharmacol. Ther. — 1997. — Vol. 11 (Suppl. 1). — P.11-20.
12. Battaglia G., DiMario F., Pasini M. et al. *Helicobacter pylori* infection, cigarette smoking and alcohol consumption. A histological and clinical study on 286 subjects // The Italian Journal of Gastroenterology. — 1993. — Vol.25. — № 8. — P.419-424.
13. Gilvarry J.M., Leen E., Sweeney E., O'Morain C.A. The Long-term effect of *Helicobacter pylori* on gastric mucosa // Eur. J. Gastroenterol. Hepatol. — 1994. — Vol.6. — P.43-45.