

**Государственное образовательное учреждение
дополнительного профессионального образования
Уральская государственная медицинская академия
дополнительного образования**

Сарсенбаева А.С.

Игнатова Г.Л.

Воротникова С.В.

Методы диагностики инфекции
Helicobacter pylori

Учебное пособие

РАССМОТРЕНО
на заседании УМК
Протокол № _____
от «___» _____ 200__ г.
Председатель УМК
_____ В.А. Романенко

УТВЕРЖДЕНО
на заседании Ученого Совета

«___» _____ 200__ г.

Челябинск

2005

УДК: 616. 985 – 07

Кафедра терапии, фтизиопульмонологии и профпатологии

Авторы: доцент Сарсенбаева А.С., заведующая кафедрой,
профессор Игнатова Г.Л., врач гастроэнтеролог Воротникова С.В.

Рецензенты:

Калинин А.В. доктор медицинских наук, профессор, Академик
РАЕН, заведующий кафедрой гастроэнтерологии Государственного
института усовершенствования врачей министерства обороны РФ

Нечаева Г.И. доктор медицинских наук, профессор, заведующая
кафедрой внутренних болезней и семейной медицины ГОУ ВПО
Омская государственная медицинская академия

Учебное пособие посвящено методам диагностики *Helicobacter pylori* – инфекции. Подробно представлены характеристики всех известных на сегодняшний день методов диагностики *Helicobacter pylori* с указанием их чувствительности, специфичности, преимуществ и недостатков, стоимости – эффективности, изложены особенности применения методов для первичной диагностики и для оценки качества эрадикации. Пособие подготовлено с учетом литературных и собственных данных.

Пособие предназначено для врачей-терапевтов, гастроэнтерологов, врачей общей практики, педиатров, хирургов, эндоскопистов, бактериологов, иммунологов, научных работников

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота

ИФА – иммуноферментный анализ

СОЖ – слизистая оболочка желудка

ПЦОР – прогностическая ценность отрицательного результата

ПЦПР - прогностическая ценность положительного результата

ПЦР – полимеразная цепная реакция

ЯБДК – язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки

Bab A – blood group antigen – binding adhesion

Cag A – cytotoxin – associated gene

Ice A – induced by contact with epithelium

Ig A – иммуноглобулины класса А

IgM – иммуноглобулины класса М

IgG – иммуноглобулины класса G

H. pylori - Helicobacter pylori

sIgA – секреторный иммуноглобулин А

Vac A -vacuolating – associated cytotoxin

ВВЕДЕНИЕ

Обсуждение патологии желудка, двенадцатиперстной кишки на сегодняшний день невозможно без учета хеликобактерной инфекции. На сегодняшний день совершенно определенно можно рассматривать эту проблему в четырех направлениях: *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) и гастрит, *H. pylori* и язва, *H. pylori* и MALTOMA, *H. pylori* и рак желудка. Поэтому диагностика и оценка эффективности лечения актуальны, и имеют важное практическое значение. Огромный интерес к инфекции *H. pylori* стимулировал появление множества различных методов диагностики, что создает для врачей – клиницистов и специалистов лабораторной диагностики определенные трудности в выборе адекватных и достоверных способов ее обнаружения. Несмотря на то, что проблема выявления *H. pylori* уже многократно освещалась с разных сторон, разворачиваются новые дискуссии о том, у кого надо выявлять бактерии и каким образом это делать.

Цели и задачи, которые ставит перед собой врач или исследователь, особенности обследуемого контингента диктуют использование методов диагностики *H. pylori* в зависимости от ситуации

РАЗДЕЛ I. Показания для эрадикационной терапии

В настоящее время установлено, что бактерия *Helicobacter pylori* является причиной развития хеликобактерного хронического гастрита, важнейшим фактором патогенеза язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и желудка, лимфомы желудка низкой степени злокачественности (мальт-лимфомы), а также рака желудка. Лечение ряда заболеваний гастродуоденальной зоны включает в себя в качестве обязательного компонента проведение эрадикационной терапии в случае обнаружения у больных в слизистой оболочке желудка *H. pylori*.

Согласно решений согласительного совещания ЕНPSG в Маастрихте (Нидерланды), сентябрь, 2000 г. разработаны рекомендации по выбору контингента для антихеликобактерной терапии, которые приняты и гастроэнтерологами России.

Таблица 1.

Показания для эрадикационной терапии у больных с инфекцией *H. pylori*

| Кого лечить | Научная доказательность |
|---|--------------------------------|
| Язвенная болезнь двенадцатиперстной кишки/ язвенная болезнь желудка (в стадии обострения или ремиссии, включая осложненную язвенную болезнь) | 1 |
| MALTома | 2 |
| Атрофический гастрит | 2 |
| Состояние после резекции желудка по поводу рака | 3 |
| Ближайшие родственники больных раком желудка | 3 |
| По желанию пациента (после подробной консультации с врачом) | 4 |

РАЗДЕЛ II. Общая характеристика диагностических методов

Существенная роль *H. pylori* в развитии заболеваний желудка предполагает проведение предварительного обследования пациентов с целью выявления у них данных микроорганизмов. С момента открытия *H. pylori* прошло чуть более 20-ти лет. За этот период времени было разработано большое количество методов диагностики, позволяющих выявлять и идентифицировать этот микроорганизм. Развитие и усовершенствование этих методов помогло в получении ценной информации об эпидемиологии

хеликобактериоза, сыграло большую роль в понимании патогенеза этой инфекции. Это, в свою очередь, позволило разработать наиболее эффективные схемы противохеликобактерной терапии и мероприятия, направленные на профилактику хеликобактериоза. Тем не менее, ни один из существующих методов диагностики *H. pylori* - инфекции не универсален. Пределы возможностей этих методов могут быть ограничены не только их чувствительностью, но, зачастую зависят от возраста пациента, его индивидуальных особенностей, стадии заболевания, а также индивидуальных характеристик инфекции.

Принципиальное значение для практики имеет разделение методики диагностики *H. pylori* до лечения (первичная диагностика – обнаружение инфекции для обоснования назначения лечения) и после проведения эрадикационной терапии (диагностика эрадикации – контроль успешности антибактериальной схемы).

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

1. *Бактериологический*: посев биоптата слизистой оболочки желудка на дифференциально-диагностическую среду.
2. *Морфологические*:
 - *гистологический* "золотой стандарт" диагностики *H. pylori*: окраска бактерии в гистологических препаратах слизистой оболочки желудка по Гимзе, толуидиновым синим, Вартину – Старри, Генте;
 - *цитологический*: окраска бактерии в мазках-отпечатках биоптатов слизистой оболочки желудка по Гимзе, Граму.
3. *Дыхательный*: определение в выдыхаемом больным воздухе изотопов ^{14}C или ^{13}C , которые выделяются в результате расщепления в желудке больного меченой мочевины под действием уреазы бактерии *H. pylori*.
 - *Уреазный*: определение уреазной активности в биоптате слизистой оболочки желудка путем помещения его в жидкую

или гелеобразную среду, содержащую субстрат, буфер и индикатор.

Диагностика эрадикации *H. pylori* (оценка адекватности проведенной противохеликобактериальной терапии) направлена на выявление вегетативных и кокковых форм *H. pylori*. Поэтому контроль успешности проведения антибактериального лечения требует особого подхода. Правила диагностики эрадикации по существующим рекомендациям следующие: 1. Диагностика эрадикации должна осуществляться не ранее 4 – 6 недель после окончания курса антихеликобактерной терапии, либо лечения любыми антибиотиками или антисекреторными средствами сопутствующих заболеваний.

2. Диагностика эрадикации осуществляется, как минимум, двумя из указанных диагностических методов, причем при использовании методов непосредственного обнаружения бактерии в биоптате слизистой оболочки желудка (бактериологический, морфологический, уреазный) необходимо исследование 2 биоптатов из тела желудка и 1 биоптата из антрального отдела.

3. Цитологический метод для установления эрадикации неприменим.

Особое место в диагностике инфекции *H. pylori* имеют иммуноферментный анализ и экспресс-тесты на основе иммунопреципитации, которые позволяют обнаруживать в сыворотке крови или в капиллярной крови пациентов антитела к *H. pylori*. Эти методы могут быть использованы в качестве **скрининговых** или в случае установленной болезни для первичной диагностики инфекции *H. pylori*. Понятно, что для обнаружения *H. pylori* после лечения серологические методы неприменимы, так как даже после эрадикации бактерии антихеликобактерные антитела продолжают циркулировать в крови.

Таблица 2.

Основные методы диагностики инфекции *Helicobacter pylori* и показания к их применению

| Метод диагностики | Показания к применению | Чувствительность | Специфичность |
|--------------------------|---|-------------------------|----------------------|
| Серологический | Скрининговая диагностика инфекции НР | 90% | 90% |
| Микробиологический | Определение чувствительности НР к антибиотикам | 80—90% | 95% |
| Морфологический | Первичная диагностика инфекции НР у больных язвенной болезнью | 90% | 90% |
| Быстрый уреазный тест | Первичная диагностика инфекции НР у больных язвенной болезнью | 90% | 90% |
| Дыхательный тест | Контроль полноты эрадикации | 95% | 100% |

Все существующие на сегодняшний день методы лабораторной диагностики *H. pylori* -инфекции делятся на две большие группы: **инвазивные методы** и **неинвазивные**.

Таблица 3.

Методы лабораторной диагностики *Helicobacter pylori* -инфекции

| Инвазивные методы | Неинвазивные методы |
|--|--|
| <ul style="list-style-type: none"> - Бактериологический метод - Гистологический метод - Быстрый уреазный тест - Молекулярно-биологический метод (ПЦР в биоптате) - Фазово-контрастная микроскопия | <ul style="list-style-type: none"> - Серологический метод - Молекулярно-биологический метод (ПЦР в кале, слюне) - Уреазный дыхательный тест - ИФА в кале |

Все инвазивные методы диагностики *H. pylori*-инфекции предусматривают проведение эндоскопического исследования с последующим взятием биопсийного материала. Неинвазивные методы включают в себя различного рода иммунологические исследования, позволяющие определять наличие антител в сыворотке крови или бактериального антигена в фекалиях, ПЦР исследование с определением ДНК *H. pylori* в фекалиях и уреазный дыхательный тест с C^{13} или C^{14} меченным атомом углерода.

С учетом современных рекомендаций по ведению пациентов с диспепсией неинвазивные тесты обнаружения *H. pylori* приобретают все большую значимость. В настоящее время многие клинические руководства (например, таких авторитетных организаций как Европейское общество первичной гастроэнтерологической помощи и Американская гастроэнтерологическая ассоциация) рекомендуют применение неинвазивных методов диагностики *H. pylori* у пациентов с

диспепсией. Специалисты рекомендуют использование «неинвазивной» тактики обследования и лечения для пациентов в возрасте до 45-55 лет, не имеющих тревожных симптомов (таких как анемия, снижение массы тела, пальпируемое образование в брюшной полости, дисфагия, мальабсорбция и т.д.).

Основаниями для подобных рекомендаций послужили результаты нескольких проведенных клинических исследований. Так, McCol и соавт. недавно завершили рандомизированное исследование у 708 пациентов моложе 55 лет с диспепсическими жалобами. По результатам данного исследования «неинвазивная» стратегия ведения пациентов с диспепсией оказалась столь же эффективной и безопасной, как и тактика, основанная на проведении эндоскопии. Дальнейшие исследования показали, что при указанном подходе количество проводимых эндоскопий снижается на 62%. В то же время частота разрешения симптомов и качество жизни пациентов при обоих подходах примерно одинаковы. По данным исследователей затраты на лечение одного пациента с диспепсией в течение 1 года при традиционной тактике обследования и лечения составляют в среднем 404,31 английских фунтов, в то время как «неинвазивная» стратегия стоит в среднем только 205,67 фунтов.

Анализ соотношения стоимости-эффективности различных неинвазивных методов диагностики показал, что серологические исследования являются более дешевыми, чем определение мочевины в выдыхаемом воздухе или выявление антигена *H. pylori* в фекалиях. В то же время более высокая точность двух последних методов исследования делает их сравнимыми по показателям стоимости-эффективности с серологическими методами.

С точки зрения достоверности получаемых результатов серологические тесты наименее предпочтительны. Определение мочевины в выдыхаемом воздухе требует использования дорогостоящего оборудования (масс-спектрофотометра), в то время как обычный спектрофотометр, необходимый для выявления антигена *H. pylori* в фекалиях иммуноферментным методом,

доступен для многих лабораторий, гораздо дешевле и проще в обслуживании. Таким образом, для государственной системы здравоохранения с экономической точки зрения наиболее целесообразно использование прямых неинвазивных методов определения антигена возбудителя для диагностики *H. pylori*-инфекции.

2.1 Бактериологический метод

Наибольшую информацию о *H. pylori* возможно получить только при выделении его из прижизненных биопсийных образцов. Это единственный метод исследования, обладающий 100% специфичностью. При этом виде исследования возможно не только выделение чистой культуры *H. pylori* и ее идентификация, но и изучение морфологических, биохимических и биологических свойств возбудителя.

Бактериологический метод исследования дает возможность определять антибиотикорезистентность у *H. pylori* и проводить за ней динамические наблюдения. Без бактериологического метода планировать клиническое испытание лекарственных препаратов, учитывая причины неудачи эрадикации, нельзя, так как основная причина, снижающая процент эрадикации, – антибиотикорезистентность *H. pylori*.

В эпидемиологической практике выделение чистой культуры *H. pylori* необходимо для внутривидового типирования штаммов, что может быть использовано при мониторинге для дифференциации между реинфекцией новым штаммом и рецидивированием, которое может быть обусловлено тем же штаммом.

В научной практике бактериологический метод важен, так как позволяет изучать факторы патогенности *H. pylori*, изготавливать препараты для серологической диагностики, создать банк штаммов для эпидемиологических и других исследований, так как штаммы бактерии в замороженном виде при температуре -70°C могут храниться в течение 5-7 лет. Без этого метода невозможно дальнейшее научное изучение микроорганизма.

Однако этот метод достаточно дорогой. Кроме того, он сопряжен с определенными трудностями, обусловленными необходимостью наличия специальных сред, оптимальной температуры, влажности, качества атмосферного воздуха и т.д. Это приводит к тому, что рост колоний микроорганизмов удается получить далеко не всегда. Неудобство метода связано и с тем, что его результатов приходится ждать, как правило, не менее 10-14 дней. В клинической практике он применяется в основном в случаях инфекции *H. pylori*, резистентной к обычным схемам антигеликобактерной терапии.

H. pylori крайне «капризен», требует специальных условий культивирования и дорогостоящего оборудования. Большой шаг вперед в успешном культивировании *H. pylori* принадлежит транспортным средам, которые дают возможность продлить срок транспортировки биоптата из эндоскопического кабинета в микробиологическую лабораторию до суток (среды Стюарта, Кэри-Блэйера, Био Мерью).

Таблица 4.

Среды, используемые для транспортировки биопсийного материала

| Время транспортировки (часы) | Среды |
|-------------------------------------|--|
| 4-6 | Физиологический раствор |
| 6-24 | Тиогликолевая среда Cary-Blaer Semi-solid Stuart's (STM) |
| До 48 | <i>Pylori</i> |

Следующий шаг – посев биоптата на неселективные (например, агар «Колумбия») и селективные среды (селективная добавка

содержит, например ванкомицин, триметоприм, полимиксин, подавляющие сопутствующей микрофлоры) (таблица 5).

Таблица 5.

Питательные среды для выделения *H. pylori*

| Вид среды | Состав среды |
|---------------------|--|
| Неселективная среда | колумбийский агар – 37 г дистиллированная вода – 1000мл стерильная цельная баранья, лошадиная, или кроличья кровь – 100 мл |
| Селективная среда | полмиксин В – 2500 МЕ/л ванкомицин – 10 мг/л триметоприм – 5 мг/л амфотеррицин В – 10 мг/л трифенилтетразолий хлорид – 40 мг/л |

Посевы инкубируются при температуре 37°С, влажности 98%, в микроаэрофильных условиях в течение 3-10 сут. *H. pylori* растет в атмосфере, содержащей 5% кислорода, 5-10% углекислого газа, остальное составляет азот. Для данного микроорганизма губительны как анаэробные условия, так и более высокое содержание кислорода. Для создания микроаэрофильной атмосферы используют газогенераторные пакеты, которые продуцируют газовые смеси после добавления в них воды. Оптимальный рост колоний наблюдают при рН среды от 6,7 до 8,0. Многие штаммы *H. pylori* могут расти и развиваться в достаточно широком диапазоне температур при +32°С... +39°С, но не растут при +27°С ... +42°С. Время инкубации: первичное исследование – 7 дней, контроль лечения - 14 дней.

На неселективной питательной среде *H. pylori* на 3-5 сутки при первичном посеве и на 2 сутки при пересевах чистой культуры формирует мелкие, круглые, гладкие, прозрачные, росинчатые колонии диаметром 1-3 мм. На селективной питательной среде

колонии *H. pylori* приобретают характерное золотисто-желтое окрашивание, за счет присутствующего в этой среде трифенилтетразолий хлорида.

При появлении колоний, сходных по морфологии с *H. pylori* (диаметром до 0,5 – 2 мм в виде «капель росы» или при сплошном росте, образующие прозрачную пленку), происходит их идентификация. Предложена методика полуколичественного определения обсеменения СОЖ в зависимости от числа выросших микробных колоний: до 10 колоний в чашке (1+), 10-20 колоний (2+), 20-50 колоний (3+), более 50 колоний (4+).

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

2.2 Морфологические методы

Гистологический метод

«Гистологический» метод выявления *H. pylori* считают «золотым стандартом» диагностики инфекции. Его специфичность оценивается как 97%, а чувствительность – 80-90%. Это прямой метод диагностики *H. pylori*, для которого используют окраски акридиновым оранжевым, по Гимзе, Граму, толуидиновым синим, серебрением по Вартину – Старри и др., он позволяет не только с высокой степенью надежности выявить наличие НР, но и количественно определить степень обсеменения. Наиболее чувствительными оказались окраски: акридиновым оранжевым (85%) и по Гимзе (79%); несколько меньше – по Грамму (72%) и по Вартин-Старри (67%) (Simog A.E. и осавт., 1990)

H. pylori располагаются обычно в СОЖ параллельно тяжам мукопротеина, главным образом в зоне межклеточных контактов, могут иметь спиралевидную, изогнутую, S-образную форму, могут быть в виде "крыльев летящей чайки".

Степень обсемененности слизистой оболочки желудка инфекцией *H. pylori* оценивается методом световой микроскопии

по критериям Аруин Л.И. с соавт. (1993), 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.

Взятие биопсийного материала производится из мест с максимально выраженной гиперемией и отёком. Взятие материала из дна язв и эрозий, а также из их краев, является ошибкой, поскольку в них нет эпителиальных клеток, обладающих свойствами, необходимыми для адгезии и колонизации *H. pylori*. Поскольку бактерии *H. pylori* могут быть разбросаны по СОЖ в виде очагов, то для повышения чувствительности метода биоптаты целесообразно брать из разных частей желудка.

Таблица 6.

Количество биопсийных образцов для диагностики *H. pylori*

| 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 |

Возможность оценить состояние слизистой оболочки желудка, а не только наличие *H. pylori* – огромное преимущество гистологического метода. Для оценки выраженности морфологических изменений слизистой оболочки желудка пользуются визуальной аналоговой шкалой (Dixon M.F. et al., 1994).

Морфологическое исследование позволяет выявить в клетках слизистой оболочки наличие пролиферативных процессов, степень их выраженности, метаплазию (кишечную в желудке и желудочную в двенадцатиперстной кишке), малигнизацию. Критерием начальной атрофии является снижение высоты желез, выраженной атрофии – определение в поле зрения менее 3-4 поперечно срезанных желез. При обнаружении кишечной

метаплазии оценивают ее тип. I тип (полная тонкокишечная) характеризуется наличием бокаловидных клеток, расположенных среди абсорбтивных с отчетливой щеточной каемкой. При II типе бокаловидные клетки разбросаны среди собственных желудка эпителиоцитов. Для III типа (неполная, толстокишечная) характерны извитые ветвящиеся крипты, выстланные клетками, напоминающими колоноциты и содержащими сульфомуцины.

По преобладанию тех или иных клеточных элементов судят об активности и выраженности воспаления. Активность фонового гастрита определялась наличием нейтрофилов в собственной пластинке слизистой оболочки желудка. Выраженность воспаления определялась степенью лимфоплазмочитарной инфильтрации собственной пластинки слизистой оболочки желудка, поверхностного и ямочного эпителия. Согласно критериям Аруин Л.И. с соавт. (1993), принято выделять три степени воспаления:

легкая – слабая инфильтрация собственной пластинки слизистой оболочки желудка;

средняя – умеренная инфильтрация собственной пластинки, поверхностного и ямочного эпителия;

тяжелая – наряду с выраженной инфильтрацией собственной пластинки слизистой оболочки желудка, поверхностного и ямочного эпителия наблюдаются внутриямочные крипт-абсцессы. Учитывается наличие лимфатических узелков (фолликулов) с герминативными центрами. Выявление их в 100% случаев позволяет диагностировать *H. pylori* инфекцию (Аруин Л.И., 1997, Комптон К.К., 1998).

Гистологическое исследование имеет ряд преимуществ: широкая доступность, удобство хранения и транспортировки препаратов и возможность их оценки в любое время любым специалистом, который легко сможет провести ретроспективный анализ. Гистологический метод позволяет оценить любую из форм повреждения СО желудка. Исходя из этого, прямая визуализация *H. pylori* является «золотым стандартом» диагностики геликобактериоза.

Цитологический метод

Используется только в России. Метод основан на выявлении бактериальных тел в мазках-отпечатках биоптатов СОЖ. В зависимости от способа получения материала из желудка для дальнейшего цитологического изучения различают несколько вариантов метода:

- crush cytology – раздавливание биоптата;
- imprint, или touch cytology – прикосновение и отпечаток люминальной поверхности биоптата к предметному стеклу;
- brush cytology – получение пристеночной слизи с помощью специальной щеточки, входящей в комплект современных эндоскопов.

Мазки окрашиваются по методу Романовского-Гимзы. Бактерии располагаются в слизи, имеют спиралевидную или S-образную формы. Помимо *H. pylori* выявляется также клеточная инфильтрация, представленная лимфоцитами, нейтрофилами, плазматическими клетками и эозинофилами. По преобладанию тех или иных клеток можно приблизительно судить об активности и выраженности воспаления. Цитологическое исследование позволяет выявить наличие пролиферативных процессов, метаплазии и дисплазии, а также оценить степень их выраженности. Можно обнаружить и неопластические изменения, но этот метод недостаточно информирует о структурных изменениях СОЖ. В странах дальнего зарубежья этот метод не используется из-за его очень низкой чувствительности, которая составляет в среднем 18-20%. *H. pylori* в цитологических препаратах можно выявить только в случае максимального обсеменения слизистой оболочки.

Несмотря на существенные ограничения данной методики в диагностике *H. pylori* в нашей стране она играет не последнюю роль. Поэтому, считаем полезным остановиться на мерах оптимизации цитологического метода, предложенных отечественными специалистами для повышения диагностической значимости теста.

Сопоставление цитологических препаратов, приготовленных различными способами, показало, что и crash- и touch-способам

присущи объективные недостатки снижающие в конечном итоге качество и надежность диагностики НР инфекции. При раздавливании биоптата на предметном стекле, распределении его материала на площади, около 2 см и удалении нераздавленных фрагментов (соединительная ткань) в препарате присутствует чрезвычайно много клеточных элементов в виде отдельных клеток и эпителиальных пластов, перекрывающих слизистые наложения. Поэтому поиск бактерий в подобном препарате осуществляется по периферии клеточных скоплений. Это требует особо тщательного просмотра препарата и больших затрат времени.

При отпечатке слизи с люминальной поверхности биоптата в цитологическом препарате оказывается очень мало материала для исследования. Слизь, как правило, не снимается полностью с поверхности слизистой оболочки, что существенно снижает надежность диагностики *H. pylori* - инфекции. Качество диагностики этим способом страдает еще больше после проведения неадекватной эрадикационной терапии, когда популяция бактерий в слизи и на поверхности слизистой оболочки снижается, но не уничтожается.

С точки зрения надежности диагностики НР инфекции, наиболее приемлемым оказался brush-способ. При этом необходимо учитывать, что щеточное снятие слизи с поверхности слизистой оболочки в нескольких местах во столько же раз повышает диагностическую надежность. Необходимо, чтобы щеточка при каждом прикосновении погружалась в слизь до клеточной поверхности слизистой оболочки. После этого слизь стряхивается и сдвигается со щеточки на предметное стекло и распределяется на площади не более 1 см

С полученным препаратом можно поступить двояко. Если материал собирается от нескольких больных, и диагностика отсрочивается на 1—2 сут, предметные стекла подсушивают на воздухе и хранят в холодильнике. В случае если диагностика осуществляется сразу, предметные стекла подсушивают и фиксируют над пламенем спиртовой горелки в течение 20—30 с на расстоянии не менее 10 см. После этого их окрашивают и изучают в световом микроскопе под иммерсией.

Для элективной окраски НР можно применять разнообразные тинкториальные методики, а также иммуноцитохимический метод. Однако при очевидных его преимуществах он пока малодоступен в практике. Однако и обычные методы окраски красителем Гимзы, акридиновым оранжевым, серебрение по Вартину—Старри и, конечно, по Граму достаточно специфичны.

Вместе с тем следует использовать и экспресс-методы окраски с доступными, дешевыми реактивами и с хорошей воспроизводимостью с минимальным числом артефактов. В результате сравнения различных способов пришли к выводу, что целесообразно использовать два из них: окраску мазков слизи 0,05% раствором акридинового оранжевого и по Граму. Для первого способа существуют два ограничения – отсутствие у исследователя люминесцентного микроскопа и кокковая форма бактерий.

Окраска акридиновым оранжевым (5 мг на 10 мл дистиллированной воды или физиологического раствора) осуществляется путем нанесения небольшой капли (15—20 мкл) на поверхность фиксированного мазка. Капля накрывается покровным стеклом, а избыток раствора по его краям отбирается фильтровальной бумагой. Через 1—2 мин препарат изучают в темном поле люминесцентного микроскопа под объективом с водной иммерсией. Бактерии специфической S-образной формы дают оранжевую флюоресценцию. Способ очень надежен для первичной диагностики и мало пригоден для оценки эрадикации.

По всем параметрам (простоте, специфичности, надежности, доступности реактивов и стоимости) способ окраски во Граму оказался наилучшим. Даже после лечения блокаторами секреции НСІ и антигеликобактерными препаратами подтверждена надежность способа при дифференциальной оценке вида кокковой микрофлоры.

При окраске по Граму цитологических препаратов для диагностики НР-инфекции есть особенности при приготовлении красителей и окрашивании, которые необходимо учитывать для достижения хорошего качества. Если обычно используется 1% раствор генциан- или кристаллвиолета, то в нашем случае раствор

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.

Оптимальный режим окраски цитологического препарата по Граму для диагностики НР-инфекции имеет следующий алгоритм:

- фиксировать препарат над пламенем, как указано выше;
- покрыть зону окрашивания фильтровальной бумагой и нанести на нее несколько капель 0,1% раствора генцианвиолета на 20—30 с;
- снять фильтровальную бумагу и промыть слабой струей проточной воды;
- осушить и налить на стекло несколько капель водного раствора Люголя на 2 мин;
- смыть раствор слабой струей воды и осушить;
- обесцветить в 2 сменах смеси спирта и ацетона (1: 1) путем 4—5-кратного погружения в каждый;
- смыть проточной водой с двух сторон стекла и осушить;
- окрасить 0,1% водным раствором сафранина О в течение 2 мин;
- смыть краску проточной водой и окончательно высушить препарат.

Таким образом, для оптимизации цитологической диагностики инфекции *H. pylori* и оценки ее эрадикации необходимо исследовать полученную brush-способом слизь, взятую не менее чем из 4 участков обоих отделов желудка.

Для повышения качества диагностики и снижения числа ложноположительных результатов при оценке эрадикации необходимо использовать окраску цитологических препаратов по Граму в предложенной модификации.

Фазово-контрастная микроскопия

H. pylori может быть обнаружен до микробиологического или

гистологического исследования при помощи фазово-контрастной микроскопии. Этот метод весьма удобен для обнаружения *H. pylori*, при условии достаточно высокой степени обсеменения.

Преимущества фазово-контрастной микроскопии:

- нет необходимости проводить фиксацию материала и дополнительных окрасок ткани;
- исследование можно проводить в обычных лабораторных условиях;
- результат может быть получен через 1-2 мин.

Процедура выполнения исследования:

1. Поместить биоптат на предметное стекло.
2. Измельчить биоптат на стекле и добавить каплю физиологического раствора.
3. Поместить на измельченный биоптат покровное стекло.
4. Поместить приготовленный препарат в фазово-контрастный микроскоп.

Микроскопия проводится 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 *H. pylori*. Готовые к применению коммерческие наборы с моноклональными антителами работают при разведении 1:200000 и избирательно окрашивают только *H. pylori*. Этот метод хорошо зарекомендовал себя при исключительно низкой степени обсемененности СОЖ *H. pylori*, когда морфологический метод и уреазный тест дают ложноотрицательные или сомнительные результаты. Он также используется для выявления морфологически измененных (кокковых форм) *H. pylori*.

2.3 Методы, основанные на уреазной активности *H. pylori*

Уреазный дыхательный тест

В развитых странах в последние годы стандартным методом контроля за эрадикацией стал уреазный дыхательный тест, который

основан на способности уреазы разлагать мочевины до HCO_3^- и NH_4^+ . Из HCO_3^- образуется CO_2 , который, попадая в кровоток, затем транспортируется в легкие. Для проведения УДТ необходима мочевины, меченная радиоактивным углеродом ^{13}C или ^{14}C . Чаще в клинической практике применяется нерадиоактивный стабильный углерод ^{13}C . ^{14}C используется реже, так как является источником излучения низкоэнергетических β -частиц, которые обнаруживаются сцинтилляционным счетчиком. Изотоп количественно определяют газовым хроматомасс-спектрометром или с помощью инфракрасного и лазерного оборудования.

В начале исследования берутся 2 фоновые пробы выдыхаемого воздуха. Далее пациент съедает легкий завтрак и тестовый субстрат; 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. Результат выражается как приращение $^{13}\text{CO}_2 - \delta^{13}\text{CO}_2$, его экскреция (%) и считается положительной при значениях выше 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 считаются редкими (4-10%), 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.

Показаниями для проведения УДТ служат: эпидемиологические исследования, скрининг перед эндоскопией и наблюдение больных после лечения.

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, меченной радиоактивным изотопом, позволило свести к минимуму трудности, связанные с хранением, утилизацией и безопасностью данного изотопа. В США продажа микрокапсул с мочевиной, меченной 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 меченной 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.

Иногда используют **аэротест** – определение концентрации аммиака калориметрическим методом в выделяемом воздухе пациента, однако точность метода недостаточно высока.

Быстрый уреазный тест (оценка местной уреазной активности)

В основу определения уровня желудочной уреазной активности положен следующий принцип: уреазы катализируют быстрый гидролиз мочевины, находящейся в содержимом желудка. В результате реакции образуется аммиак и углекислый газ, рН среды сдвигается в щелочную сторону и это изменение можно зафиксировать с помощью индикатора. Быстрота изменения окраски индикатора зависит от уреазной активности, которая, в свою очередь, зависит от количества бактерий. В некоторых случаях уреазный тест становится положительным через несколько минут. При малом количестве бактерий изменение окраски в уреазном тесте может произойти через несколько часов, а иногда возможен и ложноотрицательный результат. При проведении уреазного теста нужно учитывать и тот факт, что он может быть положительным у лиц, желудок которых колонизирован *H. heilmanii*, имеющим близкое родство с *H. pylori*. В настоящее время разработано большое количество промышленно изготовленных уреазных тестов, среди которых наиболее

распространен CLO-тест (Австралия). В последующем этот метод модифицировали и упрощали: Нр-тест по Varia, CUT-тест, Campy-тест (МП ЦОЛИУВ «Стимул»), а также экспресс-методы по Arvid, Yeung, «Хеликотест-экспресс» (ЦНИИ эпидемиологии).

Коммерческий CLO-тест представляет собой гелеобразную таблетку, содержащую мочевины, феноловый красный (индикатор рН) и бактериостатический агент. Биоптат кладут на поверхность таблетки и при наличии уреазы индикатор изменяет ее окраску от желтой до малиновой. Через 20 минут этот тест положителен в 75% случаев, а через 24 часа в 95% случаев у больных с подтвержденным бактериологически хеликобактериозом.

Время появления малинового тона косвенно указывает на количество микроорганизмов:

(+) - незначительная инфицированность (малиновое окрашивание к концу суток);

(++) - умеренная инфицированность (малиновое окрашивание в течение 2 часов);

(+++) - значительная инфицированность (малиновое окрашивание появляется в течение первого часа)

(-) - отрицательный результат (малиновое окрашивание не наступает).

В России чаще всего используется уреазный тест, приготовленный, непосредственно в лаборатории. Этот тест экономичен, надежен, прост в использовании.

Применяемые реагенты:

Мочевина - 2 г

Феноловый красный 0,5% - 10 г

Азид натрия - 20 мг

0,01М фосфатный буфер рН 6,5 - 100 мл

Метод приготовления:

Готовят по обычной рецептуре: 0,01М фосфатный буфер рН 6,5 разливают по флаконам, стерилизуют при +121°C 15 мин. К охлажденному буферу добавляют мочевины - 2 г, раствор фенолового красного и азид 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°С...+6°С.

Процедура выполнения теста (с 2% мочевиной):

1. Поместить 2 капли реагента в пробирки типа эппендорф.
2. Поместить биопсийный материал в первую пробирку, вторая пробирка используется в качестве контрольной.
3. Плотно закрыть пробирки.
4. Записать время начала выполнения теста.
5. Микропробирки инкубируют при температуре +37°С.
6. Учитывать результат через 20 мин, 1 ч, 3 ч, 24ч.

При проведении контроля лечения возможно увеличение интервалов времени изменения цвета реактива или получение ложноотрицательных результатов, поэтому тест в данном случае считается неспецифичным.

Таблица 7.

Учет результатов и показатели изменения времени окраски реагента через определенные промежутки времени

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

Последующие модификации БУТ 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.

К недостаткам теста относится его инвазивность, получение ложноотрицательных (при малом количестве микробных тел) или ложноположительных (контаминирование материала другими уреазопродуцентами) результатов, а также невозможность оценить состояние СОЖ.

Этот тест неприемлем для выявления других возможных очагов локализации *H. pylori* в желудочно-кишечном тракте - в ротовой полости и толстой кишке из-за нейтральной среды и из-за присутствия там большого количества других уреазопродуцентов. Экспрессия фермента характерна для таких микроорганизмов, как *Proteus mirabilis*, *Proteus vulgaris*, *Morganella Morganii*, *Providencia rettgeri*, *Providencia stuartii*, *Klebsiella pneumoniae*, *Klebsiella oxitoca*. Невозможность использования уреазного теста для обнаружения во внешней среде очевидна не только из-за его недостаточной чувствительности, но и потому, что *H. pylori* принимают кокковую форму, которая не проявляет ферментативной активности.

Несмотря на указанные недостатки БУТ, предлагаемый для идентификации *H. pylori* в эпителии желудка вполне адекватен требованиям диагностики, так как ни один другой микроорганизм не заселяет СОЖ в таком большом количестве и не обладает столь мощной уреазной активностью. Преимуществами уреазных тестов является их простота и возможность получения быстрого (в течение нескольких часов, минут) ответа.

Хелик-тест

Экспресс-метод (Корниенко Е.А., Милейко В.Е., 1996, патент № 2100010), основанный на уреазной активности *H. pylori*, неинвазивный. Разработанный учеными Санкт-Петербурга "Хелик-тест" базируется на кинетической оценке концентрации аммиака в воздухе полости рта, после приема пациентом порции карбамида (500мл) обычного углеродного состава.

Пациент выдыхает в индикаторную трубку 2 литра воздуха из ротовой полости. Оценивается индикационный эффект (размер

темно-синего столба) по шкале или коэффициенту пересчета C (mg/m^3) = $K(0,1) \times L(\text{mm})$, то есть один миллиметр соответствует $0,1 \text{ mg}/\text{m}^3$. Затем пациенту предлагается выпить 10 мл 5% водного раствора карбамида (0,5г) и 10 мл воды – запить. Через 5 минут повторяли процедуру измерения с другой стороны той же индикаторной трубки. Оценивали прирост концентрации аммиака. Если прирост превышал $0,5 \text{ mg}/\text{m}^3$, то тест на *H. pylori* считается положительным. Селективность и чувствительность теста 95-97 %.

Есть и другие не столь оптимистичные мнения в отношении чувствительности и специфичности данного метода. В соответствии с критериями доказательной медицины, рекомендованными для оценки точности диагностического метода, был проведен анализ информативности "Хелик-теста" (И. Ю. Исаенко, Воронеж). Такими критериями были: чувствительность, специфичность, диагностическая эффективность, прогностическая ценность положительного результата (ПЦПР), прогностическая ценность отрицательного результата (ПЦОР).

Чувствительность "Хелик-теста" по сравнению с цитологическим методом составила 100%, специфичность - 0%, диагностическая эффективность - 50%, ПЦПР - 56%, ПЦОР - 0%. Полученные данные связаны с тем, что слизь, как правило, не снимается полностью с поверхности слизистой оболочки, что снижает надежность диагностики хеликобактериоза. С другой стороны, уплотненный слой слизи при обезвоживании ткани отслаивается, а если и сохраняется, то при стандартных методах окраски очень сложно дифференцировать бактериальные тела.

Чувствительность метода по сравнению с уреазным тестом составила 90%, специфичность - 36%, диагностическая эффективность - 63%, ПЦПР - 56%, ПЦОР - 80%. Положительные результаты "Хелик-теста" при отрицательных данных уреазного теста могут быть связаны с невысокой степенью обсемененности ткани, из-за чего и суммарная уреазная активность инфекции может быть низкой. Вместе с тем иногда встречаются уреазонегативные штаммы бактерии, которые нельзя обнаружить с помощью уреазного теста.

Проведенный сравнительный анализ диагностической информативности "Хелик-теста" со стандартными методами выявления *Helicobacter pylori* позволяет сделать следующие выводы:

1. Чувствительность "Хелик-теста" составляет 100 - 90%, следовательно, отрицательный результат теста позволяет с большой вероятностью исключить данную инфекцию.

2. Специфичность составляет 30 - 36%, что означает высокую вероятность ложноположительных результатов.

3. Диагностическая эффективность - 63 - 65%, что позволяет использовать метод для исключения хеликобактериоза, а для подтверждения *Helicobacter pylori* требуется использование других методов.

4. Прогностическая ценность положительного результата 42 - 56%, прогностическая ценность отрицательного результата 80 - 100%.

2.4 Иммунологические методы

ИФА-метод выявления антител к *H. pylori* в сыворотке крови

В ответ на инвазию слизистых оболочек *H. pylori* включается В-клеточное звено иммунитета и синтезируются антигеликобактерные антитела классов IgG и IgA. Характерный для раннего иммунного ответа синтез Ig M не установлен ни в одном исследовании. Это обстоятельство может свидетельствовать о длительном течении геликобактерной инфекции до ее клинических проявлений. IgA вырабатываются как в слизистой оболочке ЖКТ, так и секретируются в слизистые оболочки из плазмы крови. IgG поступают из плазмы, где сохраняются длительное время, по-видимому, в течение всей жизни.

Иммунологические методики основаны на выявлении антител классов IgG, IgA в крови и секреторных sIgA в слюне и желудочном соке. Колонизация *H. pylori* вызывает системный иммунный ответ. Через 3-4 недели после инфицирования в слизистой оболочке и в крови больных появляются антитела к *H. pylori*. Они определяются путем иммуноферментного анализа.

Поскольку инфекция является хронической и спонтанный ее клиренс невозможен, положительные серологические тесты у нелеченных пациентов указывают на наличие текущей инфекции. Несмотря на то, что уровень антител в процессе успешной эрадикации падает, серологическая реакция остается положительной в течение ряда лет. Этот «серологический рубец» ограничивает возможности исследования крови для оценки эффективности лечения или для диагностики наличия у больного НР. Однако быстрое падение уровня антител косвенно может указывать на санацию СО желудка. Имеется несколько модификаций этого теста: ELISA (ферментный иммуносорбентный метод), реакции фиксации комплемента, бактериальной и пассивной гемагглютинации.

Классический иммуноферментный анализ (ИФА) с количественным определением в сыворотке или плазме крови больных антигеликобактерных антител разных классов характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью. Данный метод идеален для первичной диагностики, так как при высокой чувствительности и специфичности он на сегодняшний день самый дешевый. Повышение чувствительности и специфичности метода (вследствие совершенствования технологии) позволило применять его для диагностики эрадикации. Если 5 лет назад диагностика эрадикации с помощью иммуноферментного анализа была возможна только через 8-12 месяцев после лечения, то для выпускаемых в настоящее время наборов для ИФА этот срок уменьшился до 3 месяцев.

Использование же высокочувствительных наборов для непрямого ИФА с применением антигена *H. pylori*, меченного биотином (набор для ИФА “HELICONS-AB Ig G” производства фирмы “Consortia Lab”, Италия), позволяет зафиксировать снижение концентрации специфических антител уже через 30-40 дней после окончания успешного лечения и, таким образом, укладывается в сроки оценки эрадикации, принятые для инвазивных методов и дыхательного теста. Учитывая данное обстоятельство, а также то, что стоимость такого анализа не

намного выше стоимости обычного ИФА, следует признать его весьма перспективным.

Данная методика позволяет получить результат сразу в виде значения титра – отношение концентрации специфического антигеликобактерного IgG (в мкг) к содержанию общего IgG в сыворотке крови (в мг), а также предусматривает использование неразведенной сыворотки крови, что существенно ускоряет выполнение анализа.

Кратко протокол исследования состоит в следующем. В лунки, сенсibilизитрованные антителами барана против IgG человека, добавляли 100 мкл неразведенной сыворотки и инкубировали 30 мин при комнатной температуре. Затем после 3-кратной промывки буфером в каждую лунку добавляли 100 мкл комплекса антигена *H. pylori* с биотином и вновь инкубировали при комнатной температуре в течение 30 мин. В эти же лунки, не удаляя предыдущий реагент, добавляли 100 мкл комплекса стрептавидин-пероксидаза и инкубировали при температуре 20 минут. Лунки отмывали 5 раз буфером. В каждую лунку добавляли 100 мкл раствора субстрата (тримеилбензидин и H₂O₂) и инкубировали в течение 10 мин в темноте при комнатной температуре, а потом останавливали реакцию путем добавления в лунки 50 мкл 2N. раствора HCl. Если через 4 недели после окончания терапии значение титра уменьшалось на 20% или более по сравнению с исходными, то полагают, что в результате лечения наступила эрадикация *H. pylori*. Если же значение титра повышалось, не изменялось или уменьшение его составляло менее 20 %, то это расценивали как отсутствие эрадикации.

ИФА-метод выявления антител к *H. pylori* в капиллярной крови

В последние годы наблюдается исключительно бурное развитие иммунологических методик. Только быстрых тестов для определения в капиллярной крови больных антител к *H. pylori* производится в мире более 20 видов. В России зарегистрирован тест Fast-Read HP (CQI-Biomed, ЗАО ПРОТЕА), чувствительность и специфичность которого составляют 94% и 98% соответственно

(по сравнению с иммуноферментным анализом). Преимуществом таких тестов является быстрота их выполнения (в пределах 15 минут) и отсутствие необходимости в дополнительном оборудовании и персонале. Однако стоимость одного анализа в два раза выше, чем стоимость анализа, выполненного обычным иммуноферментным методом.

Больше всего такие тесты подходят для использования в поликлинических условиях, когда необходимо получить ответ об инфицированности больного непосредственно на амбулаторном приеме, чтобы сразу назначить лечение. Недостатком быстрых тестов является невозможность их использования для контроля за эрадикацией, что связано с технологией, положенной в основу методики.

ИФА-метод выявления антигена *H. pylori* в кале

Несколько лет назад в Европе появился новый неинвазивный тест, на основе ИФА, позволяющий определять антиген *H. pylori* в кале - Premier Platinum HpSA (Meridian Diagnostics, Италия). Многочисленные мультицентровые исследования, как в нашей стране, так и за рубежом показали высокую чувствительность и специфичность этого теста при первичной диагностике *H. pylori*-инфекции и контроле лечения (А. Markristatis, 1998; D. Vaira, 1999; В.М. Говорун, 2000). Этот тест был признан "золотым стандартом" в диагностике *H. pylori*-инфекции. Более того, полученные данные свидетельствуют, что с помощью этого теста можно мониторировать лечение, то есть прогнозировать эффект антигеликобактерной терапии. Единственным ограничением широкого использования этого теста в клинической практике остается его высокая стоимость по сравнению с другими методами диагностики хеликобактериоза.

2.5 Молекулярно-биологические методы

Полимеразная цепная реакция

Метод предназначен для качественного обнаружения ДНК *H. pylori* в биологических образцах (биоптаты антрального отдела желудка, биоптаты двенадцатиперстной кишки, биоптаты десен, мазки из зубодесневого кармана, слюна). Позволяет оценить

генотипические и фенотипические характеристики возбудителя. Почти у каждого пациента имеется уникальный штамм *H. pylori*. Выявлено, что вирулентность *H. pylori* во многом обуславливает клинические проявления инфекции. Существует ряд генов, продукты которых – белки Cag A, Vac A, Ice A, Bab A – полагают факторами патогенности. В зависимости от их наличия выделяют два типа штаммов НР. Экспрессирующие Cag A- и Vac A-токсин относятся к первому типу, штаммы второго типа не экспрессируют указанные гены и считаются менее патогенными. Среди большого многообразия гибридизационных методов анализа ДНК, метод ПЦР наиболее широко используется в клинической лабораторной диагностике.

Принцип метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) (Polymerase chain reaction (PCR)) был разработан Кэри Мюллисом (фирма “Cetus”, США) в 1983г. и в настоящее время широко используется как для научных исследований, так и для диагностики в практическом здравоохранении и службе госсанэпиднадзора (генотипирование, диагностика инфекционных заболеваний).

В основе метода ПЦР лежит природный процесс - комплементарное достраивание ДНК матрицы, осуществляемое с помощью фермента ДНК-полимеразы. Эта реакция носит название репликации ДНК.

Естественная репликация ДНК включает в себя несколько стадий:

- 1) **Денатурация ДНК** (расплетение двойной спирали, расхождение нитей ДНК);
- 2) **Образование коротких двухцепочечных участков ДНК** (затравок, необходимых для инициации синтеза ДНК);
- 3) **Синтез новой цепи ДНК** (комплементарное достраивание обеих нитей)

Данный процесс можно использовать для получения копий коротких участков ДНК, специфичных для конкретных микроорганизмов, т.е. осуществлять целенаправленный поиск таких специфических участков, что и является целью

генодиагностики для выявления возбудителей инфекционных заболеваний.

Комплементарное достраивание цепи начинается не в любой точке последовательности ДНК, а только в определенных стартовых блоках- коротких двунитевых участках. При присоединении таких блоков к специфическим участкам ДНК можно направить процесс синтеза новой цепи только в этом участке, а не по всей длине ДНК цепи. Для создания стартовых блоков в заданных участках ДНК используют две олигонуклеотидные затравки (20 нуклеотидных пар), называемые праймерами. Праймеры комплементарны последовательностям ДНК на левой и правой границах специфического фрагмента и ориентированы таким образом, что достраивание новой цепи ДНК протекает только между ними.

Таким образом, ПЦР представляет собой многократное увеличение числа копий (амплификация) специфического участка ДНК катализируемое ферментом ДНК- полимеразой.

Методика проведения анализа с использованием метода ПЦР включает три этапа:

первый этап: выделение ДНК (РНК) из клинического образца

второй этап: амплификация специфических фрагментов ДНК

третий этап: детекция продуктов амплификации

Выделение ДНК (РНК)

На данной стадии проведения анализа клиническая проба подвергается специальной обработке, в результате которой происходит лизис клеточного материала, удаление белковых и полисахаридных фракций, и получение раствора ДНК или РНК, свободной от ингибиторов и готовой для дальнейшей амплификации. Выбор методики выделения ДНК(РНК) в основном определяется характером обрабатываемого клинического материала.

Амплификация специфических фрагментов ДНК

На данной стадии происходит накопление коротких специфических фрагментов ДНК в количестве, необходимом для их дальнейшей детекции. В большинстве методик определения

специфических фрагментов генома используется т.н. “классический вариант направленной ПЦР. Для повышения специфичности и чувствительности анализа в некоторых методиках используется метод “гнездовой” (nested) ПЦР, в котором используются 2 пары праймеров (“внешние” - для 1 стадии, и “внутренние” - для 2-ой стадии).

Детекция продуктов амплификации

В большинстве методик на данном этапе проводится разделение смеси продуктов амплификации, полученной на 2-ой стадии, методом **горизонтального электрофореза в агарозном геле**. До проведения электрофоретического разделения, к амплификационной смеси добавляется раствор бромистого этидия, образующий с двухцепочечными фрагментами ДНК прочные соединения внедрения. Эти соединения под действием УФ-облучения способны флуоресцировать, что регистрируется в виде оранжево-красных светящихся полос после электрофоретического разделения амплификационной смеси в агарозном геле.

В качестве альтернативы электрофоретическому методу детекции, имеющему некоторые недостатки: субъективность чтения результатов, ограничения по определению ДНК различных микроорганизмов в одной реакции, могут быть предложены **гибридизационные схемы детекции**. В этих схемах образующийся в результате амплификации фрагмент ДНК гибридизуется (образует 2-х цепочечные комплексы - "гибриды") со специфическим олигонуклеотидным зондом. Регистрация таких комплексов может быть проведена колориметрически или флуориметрически. В НПФ "Литех" созданы наборы для детекции на основе гибридизации с флуориметрической регистрацией результатов.

Для получения достаточного количества копий искомого характеристического фрагмента ДНК амплификация включает несколько (20-40) циклов.

Особенности взятия биопсийного материала.

Взятие биопсийного материала проводится во время эндоскопического исследования. Перед началом противохеликобактерной терапии биопсийный образец берется из

антрального отдела желудка. При контроле лечения взятие биопсийного образца проводится не ранее чем через 4 недели после проведения противохеликобактерной терапии из тела желудка. Взятый биопсийный образец опускается в стерильную сухую пробирку (эппендорф) и немедленно доставляется в лабораторию. Для более длительного хранения возможна заморозка взятого биопсийного материала при температуре -20°C .
Особенности взятия биоптатов десен, мазков из зубодесневого кармана и слюны.

Биопсийный материал из десен, мазки из зубодесневого кармана и слюна берутся у пациентов с гастродуоденальной патологией в анамнезе при наличии у них гингивитов и парадонтоза.

Взятый биопсийный образец опускается в стерильную сухую пробирку (эппендорф) и немедленно доставляется в лабораторию. Для более длительного хранения возможна заморозка взятого биопсийного материала при температуре -20°C . Мазки из зубодесневого кармана собираются в стерильную пробирку (эппендорф) с физиологическим раствором. В этом случае пробирки могут храниться в холодильнике ($+4- +6^{\circ}\text{C}$) не более 12 часов, а их транспортировка осуществляется в сумке-холодильнике.
Особенности взятия (сбора) слюны

За 12- часов до взятия (сбора) слюны исключается прием пищи, алкоголя и лекарственных препаратов. Непосредственно перед сбором слюны необходимо исключить использование зубной пасты и удалить зубные протезы. Перед тем, как собрать слюну необходимо почистить зубы без зубной пасты, затем хорошо прополоскать рот без использования раздражающих средств. Далее, общую слюну (смешанную) выплевывают изо рта или отсасывают со дна рта одноразовым шприцем и переносят в пробирку (эппендорф). Слюна может храниться в холодильнике ($+4- +6^{\circ}\text{C}$) не более 12 часов, а ее транспортировка осуществляется в сумке-холодильнике.

Существует неинвазивный вариант ПЦР-диагностики геликобактериоза с использованием кала в качестве материала для исследования (Premier Platinum HpSA).

ПЦР в кале

Попытки создания альтернативного, более дешевого, неинвазивного метода диагностики *H.pylori*-инфекции на основе ПЦР до настоящего времени заканчивались неудачей из-за большого количества ложно-положительных результатов (А. Markristatis, 1998; D. Vaira, 1999; L Trevisani, 1999). Тем не менее, на базе научной лаборатории НПФ "ЛИТЕХ" был разработан новый тест для диагностики *H.pylori*-инфекции в кале на основе ПЦР.

Чувствительность нового неинвазивного метода диагностики *Helicobacter pylori*-инфекции в кале у взрослых составила 91,1%. Созданная тест-система на основе ПЦР, позволяет верифицировать ДНК *H.pylori* в кале у детей и взрослых и не уступает по чувствительности и специфичности Premier Platinum HpSA - тесту.

При проведении первой серии экспериментов верификации ДНК *H.pylori* в кале у взрослых чувствительность созданного теста оказалась значительно ниже и составила 75,6%. Было сделано предположение, что снижение чувствительности ПЦР-теста при первичной диагностике *H.pylori*-инфекции у взрослых связано, скорее всего, с более длительной эвакуацией каловых масс. Более длительная эвакуация каловых масс у взрослых, по сравнению с детьми, по-видимому, способствовала разрушению ДНК *H.pylori*. В связи со сделанным предположением, для увеличения скорости эвакуации кала, всем взрослым пациентам накануне исследования в качестве слабительного была назначена *лактоулоза* (Дюфалак) Солвей Фарма, Франция по 30 мл утром и вечером. После назначения слабительного и сокращения времени эвакуации кала чувствительность ПЦР-метода при первичной диагностике *H.pylori*-инфекции у взрослых стала такой же, как при первичной диагностике у детей и составила 91,1%.

Использование ПЦР-теста на 4-ой неделе после успешно проведенной противохеликобактерной терапии показало низкую специфичность теста, которая составила - 75,7%. При проведении контроля лечения на 6-ой неделе была отмечена тенденция к снижению количества ложноположительных результатов и

специфичность, составила - 93,9%. На 8-ой неделе специфичность теста составила 100%. Не было получено ни одного ложноположительного результата.

В 1999 г L. Trevisani и соавт. в 2000 г R. Ohkura и соавт. также обратили внимание на высокий процент ложноположительных результатов при постановке Premier Platinum HpSA теста на 4-6 неделе после успешно проведенной противохеликобактерной терапии. Полученные ложноположительные результаты они объяснили возможностью персистенции в организме пролеченных пациентов кокковых форм *H. pylori*, количество которых, скорее всего, начинает со временем снижаться и полностью отсутствует на 8-12 неделе. G. Masoero и соавт. показали, что подобные проблемы могут встречаться и при использовании для контроля лечения ¹³C УДТ.

Тем не менее, следует отметить, что потеря специфичности при использовании неинвазивных методов для контроля лечения не сопровождается потерей их чувствительности.

К преимуществам созданного НПФ «Литех» ПЦР-теста можно, прежде всего, отнести его неинвазивность, простоту и быстроту выполнения (на постановку 30 исследований необходимо 4,5 - 5 часов) и относительно низкую себестоимость по сравнению с ИФА, дыхательным тестом, бактериологическим и гистологическим методами исследования. Ввиду невысокой стоимости данного теста он может быть использован не только для первичной диагностики *H. pylori*-инфекции, но и для эпидемиологических исследований.

РАЗДЕЛ III. Результаты собственных исследований

Обследовано 93 больных с язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки (ЯБДК) в фазе обострения. Больных с ЯБДК, осложненной кровотечением, было 136 человек, неосложненного течения – 107. В группу исследования были включены только мужчины. Формирование группы обеспечивало ее однородность, что позволило исключить различия гормонального фона и их влияние на течение заболевания, иммунную систему. Средний возраст больных с осложненным течением ЯБДК составил $40,8 \pm 3,54$ года. Больные с

неосложненным течением ЯБДК были сопоставимы по возрасту ($41,3 \pm 4,79$ года) и длительности заболевания с основной группой. Около 30% больных ЯБДК с кровотечениями были в возрастных группах 20-29 и 40-49 лет. В 13% случаев ЯБДК манифестировала с осложнения в виде кровотечения.

Пациентам проводилось эндоскопическое исследование с прицельной биопсией в 2 точках из СО антрального отдела желудка и в 2 точках из тела желудка. Для диагностики *H. pylori* применялся гистологический метод, ПЦР в биоптате, ИФА сыворотки крови для выявления антител класса IgG к *H. pylori*, хеликостест-экспресс.

Степень обсемененности СО желудка *H. pylori* оценивали по критериям Аруин Л.И. с соавт. Оценку морфологических изменений СО желудка проводили с помощью визуально-аналоговой шкалы.

ДНК *H. pylori* в биоптатах определяли наборами реагентов «Хеликопол» НПФ «Литех» (Россия). Амплификацию проводили в программируемом термостате для проведения ПЦР – анализа ТПЧ-ПЦР-01- «Терцик». После 40 циклов продукты амплификации идентифицировали в 1,5% агарозном геле в присутствии бромистого этидия со смесями праймеров *Ca*_gA, *Vac*A, *Ice*A, *Bab*A.

Для серологического исследования на антитела к *H. pylori* использовали диагностические наборы «BCM DIAGNOSTIC SYSTEMS LABORATORIES INC –05-10 HELICOBACTER PYLORI Ig G ELISA». Образец рассматривался качественно позитивным на наличие специфических Ig G если отношение между средним значением образца и Cut – Off >1 ; сомнительным, если $+10\%$ от Cut – Off; негативным, если отношение $<0,9$. По количественному критерию результат считали положительным при показателе оптической плотности >15 арбитражных единиц (AU).

Экспресс-метод, основанный на уреазной активности *H. pylori*, неинвазивный (Корниенко Е.А., Милейко В.Е., 1996, патент № 2100010).

Результаты диагностики *H. pylori* гистологическим методом из антрального отдела СОЖ при тяжелом течении ЯБДК

представлены в таблице 8 (дополнительно проанализированы архивные данные еще 150 больных ЯБДК).

Таблица 8.

**Результаты диагностики *H. pylori*
гистологическим методом у больных ЯБДК
тяжелого и нетяжелого течения**

| | ЯБДК тяжелого течения | | ЯБДК нетяжелого течения | | RR |
|--------------------------|-----------------------|------|-------------------------|------|-------|
| | Абс (n=136) | % | Абс (n=107) | % | |
| НР + | 123 | 90,4 | 102 | 95,3 | *10,9 |
| Обсемененность, степень: | | | | | |
| I | 0 | 0 | 8 | 7,8 | |
| II | 35 | 28,4 | 75 | 73,5 | |
| III | 88 | 71,6 | 19 | 18,7 | |
| НР - | 13 | 9,6 | 5 | 4,7 | |

RR – вклад степени обсемененности *H. pylori* в развитие осложнений (относительный риск);

*– $p < 0,001$, достоверность определяли по критерию Пирсона.

При тяжелом течении ЯБДК инфекция *H. pylori* выявлена в 90,4% случаев, в группе дуоденальных язв без осложнений (95,3%). В структуре степени обсемененности СОЖ *H. pylori* при тяжелых формах дуоденальных язв достоверно преобладали случаи с высокой степенью обсемененности *H. pylori* – 71,6% (RR=10,9; $\chi^2=14,76$; $p < 0,001$), в то время как у больных с доброкачественным течением преобладали случаи умеренной степени обсемененности *H. pylori* – 73,5%.

Уреаза *H. pylori* представляет собой важнейший фермент микроорганизма, определяющий основные звенья патогенеза

заболеваний, ассоциированных с *H. pylori*. Уреазы и ее продукты выступают в роли токсиканта, фактора агрессии и модулятора иммунных воспалительных реакций.

Таблица 9

Показатели положительного уреазного экспресс-теста у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки

| Концентрация аммиака, С мг/м ³ | ЯБДК | | р |
|---|-----------------|----------------|-------|
| | Осложн. (n =56) | Неосл. (n =32) | |
| | М±m | М±m | |
| Базальная, С | 0,36±0,08 | 0,47±0,06 | >0,05 |
| Нагрузочная, С ₁ | 1,60±0,07 | 1,22±0,28 | >0,05 |
| Прирост концентр., ΔС | 1,24±0,12 | 0,75±0,20 | <0,01 |

р – достоверность различий между концентрацией аммиака при осложненном и неосложненном течении ЯБДК.

У больных ЯБДК независимо от тяжести течения в 94% случаев получены критерии, позволяющие оценить тест положительно. Анализ всех составных характеристик уреазного аэротеста при ЯБДК позволяет считать только показатель прироста концентрации аммиака (ΔС) критерием наличия *H. pylori* (Муталов А.Г., 1999). Несмотря на положительные результаты уреазного аэротеста у больных с осложнениями и без осложнений, при осложнениях все же преобладает прирост концентрации аммиака (р<0,01). Это может быть обусловлено более высокой степенью контаминации слизистой гастродуоденальной зоны инфекцией *H. pylori* при осложненном течении ЯБДК, а возможно и большей агрессивностью штаммов *H. pylori* при этих клинических вариантах ЯБ (Жуховицкий В.Г., 1993). При помощи метода ПЦР положительный результат на ДНК *H. pylori* из биоптатов желудка у больных ЯБДК в обеих группах получен в 100%.

Варианты вирулентных генотипов и их частота представлены в табл. 10.

Таблица 10

Варианты вирулентных генотипов *H. pylori* у больных ЯБДК по результатам ПЦР

| n/n | Варианты генотипов <i>H. pylori</i> | ЯБДК осл. течения, (%) (n=15) | ЯБДК неосл. течения, (%) (n=11) |
|-----|-------------------------------------|-------------------------------|---------------------------------|
| 1 | cagA | - | - |
| 2 | vacA m2 | 15 | 50 |
| 3 | vacA s1/s2 | 40 | - |
| 4 | vacA s1/s2+ m1+m2 | 7 | - |
| 5 | vacA s1/s2 + m2 | 7 | 50 |
| 6 | vacA s1/s2+ cagA | 7 | - |
| 7 | vacA s1/s2 + iceA2 | 15 | |
| 8 | vacA m1 + cagA + iceA2 | 7 | |
| 9 | babA | - | - |

Вирулентные гены *H. pylori* обнаружены в биоптатах у 13 из 15 больных с тяжелым течением заболевания (86%), в группе больных с благоприятным течением заболевания - у 2 больных из 11 (18%), ($p < 0,01$). В 12 случаях при тяжелом течении (92%) вирулентные штаммы были VacA – позитивными (vacuolating-associated cytotoxin) ($p < 0,01$), из них 69% были с генотипом s1/s2. В группе больных с ЯБ ДК нетяжелого течения вирулентные штаммы были представлены в 66% VacA геном (генотип m2) с исходно незначительной токсической активностью.

В нашем исследовании смешанный генотип по аллелям VacA гена и генов CagA (cytotoxin-associated gene), Ice A (induced by contact with epithelium) определялся в 77% случаев тяжелого течения ЯБ ДК. VacA-позитивные штаммы имели варибельные

участки гена (VacA s регион и VacA m регион), с помощью которого можно идентифицировать аллельные типы. Особую значимость представляют данные о том, что большинство штаммов *H. pylori* с генотипом VacA s1 также имеют островок патогенности *cag*, что позволяет его расценивать как суррогатный маркер островка патогенности.

В ходе нашего исследования не установлено какой – либо ассоциации между BabA (blood group antigen-binding adhesin) геном *H. pylori* и клиническими вариантами ЯБДК, хотя по данным Gerhard M. et al. (1999) ген BabA2 может являться маркером для выявления больных, которые имеют высокую степень вероятности осложнений. Вероятно, у изучаемых нами штаммов *H. pylori*, высокая адгезионная способность обеспечивалась преобладанием в структуре штаммов VacA гена, изначально обладающего способностью к более сильной адгезии и внутриклеточной инвазии путем вмешательства в сигнальный каскад интегрина и полимеризации актина внутри эпителиоцитов (Su.B. et al., 1999).

Количественные показатели специфического IgG ответа на *H. pylori* у больных с осложнениями ($87,6 \pm 9,27$ AU) были достоверно ниже, чем у больных с доброкачественным течением заболевания ($137,3 \pm 9,80$ AU; $p < 0,001$). Возможной причиной этого является нестабильность генома *H. pylori*, с которой связывают полиморфизм штаммов и многообразие патологических изменений в организме человека (Hazell S.L. et al., 1997).

РАЗДЕЛ IV. Заключение

Современное состояние проблемы заболеваний желудка и двенадцатиперстной кишки предполагает обязательное обследование пациентов на наличие инфекции *H. pylori*. Имеющиеся в арсенале клиницистов методы диагностики позволяют выявить *H. pylori* практически в 100% случаев. Грамотный подход в выборе диагностического теста обеспечивает качественную, своевременную и экономичную верификацию возбудителя. Наличие международных и отечественных

рекомендаций по выявлению инфекции, основанных на многолетнем опыте, облегчает тактический поиск лечащего врача. Соблюдение этих рекомендаций делает возможным назначение адекватного лечения при хроническом гастрите и язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, предупредить их осложнения и рак желудка.

В предложенном пособии приведены сведения о существующих на данный момент диагностических методиках выявления *H. pylori*-инфекции и перспективах их усовершенствования, а также собственный клинический опыт. Сравнительный анализ диктует необходимость использования в практической деятельности комбинации диагностических тестов. Материальные затруднения не должны быть препятствием к адекватному обследованию. Актуальной проблемой геликобактериологии является разработка путей оптимизации диагностики *H. pylori* у инфицированных больных.

РАЗДЕЛ V. Контрольные тесты

1. Обязательным показанием для диагностики инфекции *H. pylori* является:

- А. Рак желудка у родственников
- Б. Язвенная болезнь желудка
- В. Эзофагит
- Г. В12-дефицитная анемия

2. «Золотым стандартом» первичной диагностики *H. pylori* является:

- А. Цитологический метод
- Б. ПЦР в кале
- В. Гистологический метод
- Г. Иммуноферментный анализ

3. «Золотым стандартом» оценки эрадикации *H. pylori* является:

- А. Дыхательный тест
- Б. Быстрый уреазный тест
- В. Иммуноферментный анализ

Г. ПЦР в биоптате

4. Когда проводится оценка эффективности эрадикации *H. pylori*:

- А. Сразу после лечения
- Б. Через 3 месяца после эрадикации
- В. Через 1 год после эрадикации
- Г. Через 4 недели после эрадикации

5. К неинвазивным методам диагностики относится:

- А. Гистологический
- Б. Быстрый уреазный
- В. ПЦР в биоптате
- Г. Дыхательный

6. Бактериологический метод позволяет оценить все, кроме:

- А. Чувствительности к антибиотикам
- Б. Морфологических изменений слизистой оболочки желудка
- В. Биохимических свойств *H. pylori*
- Г. Штаммоспецифичности *H. pylori*

7. Снижает чувствительность уреазных тестов прием:

- А. Маалокса
- Б. Мотилиума
- В. Омепразола
- Г. Фестала

8. К преимуществам гистологического метода относится возможность оценить:

- А. Биохимические свойства *H. pylori*
- Б. Характер морфологических изменений слизистой
- В. Антибиотико-чувствительность *H. pylori*
- Г. Вирулентность штаммов *H. pylori*

9. Оценить вирулентность штаммов *H. pylori* позволяет метод:

- А. Дыхательный
- Б. Гистологический
- В. ПЦР

Г. ИФА

10. Проведение дыхательного теста основано на:

- А. Уреазной активности *H. pylori*
- Б. Адгезионной способности *H. pylori*
- В. Цитотоксичности *H. pylori*
- Г. Иммуногенности *H. Pylori*

11. С какой целью в диагностике геликобактерной инфекции используется чаще всего метод определения антител к *H. pylori*

- А. Для скрининговых исследований
- Б. С целью первичной диагностики
- В. С целью контроля полноты эрадикации
- Г. С целью определения чувствительности *H. pylori* к антибиотикам
- Д. Для определения патогенных штаммов *H. pylori*

12. Назовите основные недостатки микробиологического метода диагностики геликобактерной инфекции

- А. Невозможность применения с целью первичной диагностики
- Б. Невозможность применения с целью контроля полноты эрадикации
- В. Технические трудности, связанные с выращиванием культуры *H. Pylori*
- Г. Необходимость длительного ожидания результатов исследования
- Д. Сравнительная дороговизна

ОТВЕТЫ:

1-Б 2-В 3-А 4-Г 5-Г 6-Б 7- В 8-Б 9-В 10-А 11 – А 12 – В, Г,Д

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Аруин Л.И., Григорьев П.Я., Исаков В.А., Яковенко Э.П. Хронический гастрит – Амстердам, 1993. – 362 с.
2. Бельмер С.В., Гасилина Т.В., Еремеев В.С. и др. Значение серологического выявления пилорического геликобактериоза у детей с язвенной болезнью // *Materia Medica*. – 2000. – № 2(26). – С. 88-91.
3. Говорун В.М., Момыналиев К.Т., Смирнова О.В. с соавт. Современные подходы к молекулярной диагностике и типированию клинических изолятов *Helicobacter pylori* в России // *Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол.* – 2002. – №3. - С. 57-65.
4. Говорун В.М., Гушин А.Е., Кудрявцева Л.В., Дурова О.М., Иваников И.О., Исаков В.А. Диагностика *H. pylori* молекулярным методом и с помощью количественного ИФА анализа концентрации антигена *H. pylori* в кале: результаты сравнительного исследования // Сборник тезисов докладов 3-й Всероссийской научно-практической конференции "Генодиагностика в современной медицине". - Москва, 2000. – С. 295-296.
5. Довгаль С.Г. Методы лабораторной диагностики хеликобактериоза // *Акт.пробл.инф.патол.*, Ч. 1. Спб. – 1993. – С. 21.
6. Ивашкин В.Т., Исаков В.А. Основные положения II Маастрихтского соглашения: какие рекомендации по лечению заболеваний, ассоциированных с *Helicobacter pylori*, нужны в России? // *Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол.* – 2001. - №3. – С.77-83
7. Ивашкин В.Т., Шептулин А.А. Болезни пищевода и желудка. – М.: Медпресс – информ. – 2002. – 144 с.
8. Исаков В.А. Молекулярно-генетические основы патогенности *Helicobacter pylori* // *Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол.* – 2002.- №6. – С.82-86.
9. Исаков В.А., Домарадский И.В. Хеликобактериоз. Москва, 2003. - 411с.
10. Исаков В.А., Тудиков Г.В. Серологические методы диагностики

- инфекции *Helicobacter pylori*: рекомендации и перспективы применения // Клин. лаб. диагност. – 2000. – №1. – С. 38-41.
11. Кишкун А. А. Современные методы диагностики и оценки эффективности лечения инфекции *Helicobacter pylori*// Лаб. медицина. – 2000. – №3. – С. 37-44.
12. Кудрявцева Л.В., Щербаков П.Л., Иваников И.О., Говорун В.М. *Helicobacter pylori*-инфекция: современные аспекты диагностики и терапии. – Москва, 2004. – С. 24-56.
13. Лапина Т.Л. Российские рекомендации по диагностике и лечению инфекции *Helicobacter pylori* // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол. – 1999. - №3. – С. 84-89.
14. Маев И.В., Вьючнова Е.С. Диагностика и лечение язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки. – Москва, 2003. – С. 46-55.
15. Морозов И.А. Цитологическая диагностика инфекции *Helicobacter pylori* в желудке. // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол. – 2000. - №2. – С.7-10.
16. Пасечников В.Д., Чуков С.З. Значение геномной гетерогенности штаммов *Helicobacter pylori* в развитии ассоциированной патологии гастродуоденальной зоны. // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол. и колопроктол. – 2000. - №3. – С.7-10.
17. Пиманов С.И. Эзофагит, гастрит и язвенная болезнь. – Н. Новгород, 2000. – С. 54-63.
18. Сафонова Н.В., Жебрун А.Б. Гастрит, язвенная болезнь и хеликобактериоз. - С.-Петербург, 1995. - 39с.
19. Циммерман Я.С. Хронический гастрит и язвенная болезнь. – Пермь, 2000. – С. 16-21.
20. Alm R.A., Ling L.-S.L., Moir D.T. et al. Genomic-sequence comparison of two unrelated isolates of the human gastric pathogen *Helicobacter pylori*. // Nature., 1999. - p , 397 (6715), 176-180.
21. Atherton J.C., Peek R.M.J., Tham K.T., Cover T.L., Blaser M.J. Clinical and pathological importance of heterogeneity in *vacA*, the vacuolating cytotoxin gene of *Helicobacter pylori* // Gastroenterol., 1997, jan; 112(1): 92-9.
22. Bode G., Mauch F., Malfertheiner P. The coccoid forms of *Helicobacter pylori* - criteria for their viability // Epydemiol.Infect. -

1993. - V.111, 483-490.
23. Cellini L., Allocati N., Angellutti D. et al. Coccoid *Helicobacter pylori* not culturable in vitro reverts in mice // *Microbiol.Immunol.* - 1994. - V.38, 834-850.
24. Cutler A.F., and Prasad. Long term follow-up of *Helicobacter pylori* serology after successful eradication // *Am.J. Gastroenterol.*, 1996, 31:85-88.
25. Dominiguez-Munos J.E., Leodolter A., Sauerbruch T., and Malfertheiner P. A citric acid solution is an optimal test drink in the ¹³C-urea breath test for diagnosis of *Helicobacter pylori* infection // *Gut*, 1997, 40:459-462.
26. Fung W.P., Papadimitriou J.M., Matz L.R. Endoscopic, histological and ultrastructural correlations in chronic gastritis // *Am.J.Gastroenterol.* - 1979. - V.71, 269-279.
27. Gatta L. et al. Non-invasive techniques for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection // *Clin.Microbiol. Infect.* – 2003; 9: 489-496.
28. Lau P.P., DeBrunner-Vossbrick B., Dunn B. Phylogenetic diversity and position of the genus *Campylobacter* // *Syst.Appl.Microbiol.* - 1987. - V.9, 231-238.
29. Markristatis A., Pasching E., Schutse K., Wimmer M., Rotter M.L., and Hirschl A.M. Detection of *Helicobacter pylori* in stool specimens by PCR and antigen enzyme immunoassay // *J. Clin. Microbiol.*, 1998, 36:2772-2774.
30. Masoero G., Lombardo L., Della Monica P., Andriani L., Vicari S., Sallio F., and Pera A. // *Abstr. XIIth Int. Workshop Gastrointestinal Pathol. Helicobacter pylori*, abstr. 15/33, *Gut* 45 (Suppl. 3) : A131, 1999.
31. Morris A., Nicolson G., Loud G. Et al. Seroepidemiology of *Campylobacter pylori* // *N.Z.Med.J.* - 1986. - V.99, 657-659.
32. Ohkura R., Miwa H., Murai T., Nagahara A., Ohta K., Sato K., Yamada T., and Sato N. Usefulness of a novel enzyme immunoassay for the detection of *Helicobacter pylori* in feces // *Scand.J.Gastroenterol.* - 2000; 35: 49-53.
33. Peek R.M.J., Thomppson S.A., Donahue J.P., Tham K.T., Atheron J.C., Blaser M.J., Miller G.G. Adherence to gastric epithelial cells

- induce expression of a *Helicobacter pylori* gene, *iseA*, that is associated with clinical outcome // *Proc. Assoc. Am. Physicians.*, 1998, Nov-Dec; 110(b): 531-44.
34. Pretolani S., Bonvicini R., Gasbarrini G. *Epidemiology*. In: *Helicobacter pylori. An atlas*. Ed. By P. Malrtheiner, P. Michetti, A. Price. London. - 1997, 21-2.6.
35. Sherman P., Hassall E., Hunt R.H., Fallone C.A., Veldhuzen van Zanten S., Thomson A.B.R., and the Canadian *Helicobacter* Study Group. Canadian *Helicobacter* Study Group consensus conference on the approach to *Helicobacter pylori* infection in children and adolescents // *Can.J. Gastroenterol.*, 1999, 13:553-559.
36. Sidebothman R.L., Baron J.H. Hypothesis: *Helicobacter pylori*, urease, mucus, and gastric ulcer // *Lancet*. - 1990. - V.27, 193-195.
37. Thomson L.M., Smibert R.M., Johnson J.L. Phylogenetic study of the genus *Campylobacter* // *Int.J.Syst.Bacteriol.* 1988. - V.38, 190-193.
38. Trevisani L., Sartori S., Galvani F., Rossi M.R., Ruina M., Chiamenti C., and Caselli M. Evaluation of a new enzyme immunoassay for detecting *Helicobacter pylori* in feces: a prospective pilot study // *Am. J. Gastroenterol.*, 1999, 94:1830-1833.
39. Vaira D., Malfertheiner P., Megraud F., Axon A.T.R., Deltenre M., Hirschl A.M., Gasbarrini G., O'Morain C., Pajares Garsia J.M., Qina M., Tytgat G.N.J., and HpSA European Study Group. Diagnosis of *Helicobacter pylori* infection with a new non-invasive antigen-based assay // *Lancet*, 1999, 354:30-33.
40. Warren J.R., Marshall B.J. Unidentified curved bacilli on gastric epithelium in active chronic gastritis // *Lancet*. - 1983. - p.1273-1275.

СОДЕРЖАНИЕ

| | |
|--|----|
| СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ | 3 |
| ВВЕДЕНИЕ | 4 |
| РАЗДЕЛ I. Показания для эрадикационной терапии | 4 |
| РАЗДЕЛ II Общая характеристика диагностических методов | 5 |
| 2.1 Бактериологический метод | 11 |
| 2.2 Морфологические методы | 14 |
| 2.3 Методы, основанные на уреазной активности <i>H. pylori</i> | 21 |
| 2.4 Иммунологические методы | 28 |
| 2.5 Молекулярно-биологические методы | 31 |
| РАЗДЕЛ III Результаты собственных исследований | 37 |
| РАЗДЕЛ IV Заключение | 42 |
| РАЗДЕЛ V Контрольные тесты | 43 |
| СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ | 46 |
| СОДЕРЖАНИЕ | 50 |