

ДИАГНОСТИКА *H. PYLORI*-ИНФЕКЦИИ

Н.Н. ДЕХНИЧ¹, И.А. ЭДЕНШТЕЙН²

Смоленская государственная медицинская академия,
кафедра факультетской терапии¹;
НИИ антимикробной химиотерапии²

Современные подходы к терапии *H. pylori*-инфекции основываются на выявлении возбудителя у пациента. Подтверждение наличия *H. pylori* является обязательным. Использование малочувствительных методов диагностики *H. pylori* приводит к неназначению эрадикационной терапии, прогрессированию заболевания и развитию осложнений у данного пациента.

Согласно рекомендациям Маастрихтского консенсуса III 2005 г., показаниями к проведению эрадикации *H. pylori* являются состояния, при подтверждении наличия *H. pylori* [7,8]:

- язвенная болезнь (ЯБ) желудка и 12-перстной кишки в стадии обострения или ремиссии, включая осложненную ЯБ;
- мальтома;
- атрофический гастрит;
- состояние после резекции желудка по поводу рака;
- пациенты первой степени родства больных раком желудка;
- желание пациента после подробной консультации с врачом.

Кроме того, проведение эрадикации *H. pylori* считается целесообразным:

- у пациентов с идиопатической тромбоцитопенией и необъяснимой железодефицитной анемией при подтверждении наличия *H. pylori* [6];
- у пациентов, инфицированных *H. pylori* с неязвенной диспепсией;
- при длительной терапии ингибиторами протонной помпы у больных с гастроэзофагеальной рефлюксной болезнью при подтверждении наличия

H. pylori с целью регрессии *H. pylori*-индуцированного атрофического гастрита;

- при длительной терапии нестероидными противовоспалительными препаратами при подтверждении наличия *H. pylori* с целью профилактики ulcerации и/или кровотечения [3, 7, 8].

Первыми методами диагностики *H. pylori* были способы ее обнаружения в биоптатах слизистой оболочки желудка с помощью гистологии, бактериологии или быстрого уреазного теста. Для выполнения этих диагностических тестов необходимо проведение эндоскопии. Однако существует значительная категория больных, которым эндоскопическое исследование с биопсией не рекомендуется. Это беременные женщины, больные, получающие антикоагулянты, пожилые пациенты с выраженной сердечной и дыхательной недостаточностью.

Если у пациентов нет иных показаний для использования эзофагогастродуоденоскопии (например, обследование, связанное с онкологической настороженностью), кроме диагностики *H. pylori*, то этим больным следует использовать методы диагностики *H. pylori*, не связанные с эндоскопией, т. е. неинвазивные.

При этом все методы диагностики, в которых в качестве исследуемого материала используются биоптаты, зависят от ряда факторов, таких, как место взятия биопсии, количество исследуемых биоптатов, их размер. Имеет значение также то, используется ли данный метод диагностики первично или уже после проведенного лечения. Все эти факторы могут влиять на чувствительность и специфичность данных методов [5].

Таблица 1. Основные методы диагностики инфекции *H. pylori*

Метод диагностики	Показания к применению	Чувствительность, %	Специфичность, %
Гистологический	Первичная диагностика инфекции <i>H. pylori</i>	87,8	90,5
Быстрый уреазный тест	Первичная диагностика инфекции <i>H. pylori</i>	87	86
Микробиологический	Определение чувствительности <i>H. pylori</i> к антибиотикам	80–90	100
Серологический	Скрининговая первичная диагностика <i>H. pylori</i>	95	86
Дыхательный тест	Первичная диагностика <i>H. pylori</i> и контроль эффективности эрадикации <i>H. pylori</i>	100	100

Метод диагностики	Показания к применению	Чувствительность, %	Специфичность, %
Определение антигена <i>H. pylori</i> в кале	Первичная диагностика <i>H. pylori</i> и контроль эффективности эрадикации <i>H. pylori</i>	↑90	↑90

Инвазивные методы диагностики *H. pylori*

Метод окрашивания *H. pylori* красителями в гистологическом препарате, полученном из слизистой оболочки желудка, являлся ранее «золотым стандартом» диагностики *H. pylori*. Гистологический метод позволяет охарактеризовать состояние слизистой оболочки желудка и обеспечивает возможность получения информации о наличии *H. pylori*. Гистологические препараты окрашивают по Гимзе, Вартину–Старри, толудиновым синим, по Генте, что обеспечивает визуализацию как *H. pylori*, так и основные изменения слизистой оболочки желудка, и, что особенно важно, выявление кишечной метаплазии. Чувствительность гистологического метода для первичной диагностики *H. pylori* у больных с ЯБ 12-перстной кишки составляет 87,8%, специфичность – 90,5%. Таким образом, гистологический метод диагностики *H. pylori* 4-х биоптатов (2 из антрального отдела, 2 из тела желудка) обладает относительно высокой чувствительностью и специфичностью и может использоваться в первичной диагностике *H. pylori*.

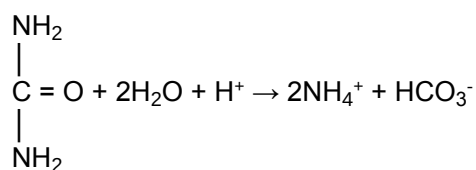
Использование цитологического метода для первичной диагностики *H. pylori* и контроля за эрадикацией, по данным различных исследований, приводит к гиподиагностике инфекции. Связано это с тем, что *H. pylori* в зависимости от условий окружающей среды может выраженно менять свою морфологию, а в этих условиях визуальная диагностика *H. pylori* на основе только тинкториальных свойств невозможна. Важным компонентом морфологической диагностики является расположение *H. pylori* относительно покровно-ямочного эпителия, которое при приготовлении мазка-отпечатка исключается из анализа. Таким образом, использование цитологического метода для контроля за эрадикацией *H. pylori* является нерациональным, так как уменьшается популяция возбудителя в слизистой оболочке желудка после проводимой антигеликобактерной терапии.

Быстрый уреазный тест заключается в том, что, гидролизуя мочевины непосредственно в слизистой оболочке желудка, *H. pylori* образует аммиак, который нейтрализует соляную кислоту и создает оптимальные условия для роста и колонизации. При pH 3–7 *H. pylori* благодаря уреазе поддерживает внутриклеточный pH, близкий к нейтральному.

Основой разработки уреазных тестов для диагностики *H. pylori* является тот факт, что никакая другая бактерия, кроме *H. pylori*, не способна продуцировать уреазу в условиях желудка в таких количествах,

чтобы она накапливалась в его слизистой оболочке. Поэтому используются методы, определяющие исключительно тканевую уреазу, а не бактериальную, то есть методы, работающие при комнатной температуре и содержащие добавки, уничтожающие любую микрофлору в биоптате.

При гидролизе мочевины под действием уреазы происходит следующее:



Образующийся в результате ион аммония приводит к выраженному увеличению pH среды, что можно зафиксировать с помощью индикатора, а следовательно и визуально по изменению окрашивания среды.

По данным исследования, в котором сравнивались различные уреазные методы диагностики *H. pylori*, их чувствительность и специфичность примерно одинаковая – ~87% и ~86% соответственно. К недостаткам следует отнести то, что, несмотря на относительно высокую чувствительность, у ряда больных *H. pylori* с помощью данных тестов не определяется. Это связано с тем, что в биоптате бактерии отсутствуют в необходимом количестве для продукции уреазы, достаточном для изменения pH-теста.

Материалом для микробиологической диагностики *H. pylori* является 4 биоптата слизистой оболочки желудка. В качестве транспортных сред используются: для короткого хранения – 0,5 мл стерильного физиологического раствора; для более длительного хранения (до 48 ч) – транспортные среды Portagerm pylori, Stuarts.

Перед посевом биопсийный материал помещают в 0,5 мл Бруцелла бульона и гомогенизируют электрическим гомогенизатором при 10 000 об/мин в течение 10–20 секунд. Затем по две капли гомогенизированного раствора помещают на поверхности чашек с питательными средами: 1 неселективной – сердечно-мозговой агар с добавлением 10% овечьей крови и 2 селективной – Pylori agar и сердечно-мозговой агар с добавлением 10% овечьей крови, полимиксина В, ванкомицина, триметоприма, амфотерицина В. Посев производят сплошным газоном с помощью стеклянного шпателя/бактериологической петли. Чашки инкубируются в течение 7–12 дней в микроаэрофильных условиях (O₂ – 11%, CO₂ – 9%,

N_2 – 80 %) с использованием газогенерирующих пакетов при температуре $+37^\circ\text{C}$ и влажности 95%.

При получении золотисто-желтых колоний, по морфологии сходных с *H. pylori*, проводится их идентификация с окраской мазка по Граму (грамотрицательные изогнутые S/V-образно палочки) и наличием уреазной, каталазной и оксидазной активности.

Показанием к проведению микробиологического исследования является неэффективность антигеликобактерной терапии с целью определения чувствительности *H. pylori* к антимикробным препаратам и дальнейшей тактики лечения. Определение чувствительности *H. pylori* к антимикробным препаратам проводится методом Е-тестов или методом разведения в агаре.

Для обнаружения фрагментов генов *H. pylori* в биоптате слизистой оболочки желудка используют полимеразную цепную реакцию (ПЦР). В зависимости от используемого праймера и особенностей методики, чувствительность метода варьирует в пределах 10–100 микробных тел. ПЦР используется как диагностический метод, а также как метод генотипирования *H. pylori*, исследуя чистую культуру или непосредственно биоптаты слизистой оболочки желудка.

При первичной диагностике чувствительность и специфичность ПЦР составляет 100%. При контроле за эрадикацией *H. pylori* через 4 недели определение фрагмента гена *ureC* с помощью ПЦР в биоптатах из антрального отдела желудка после проведенной антигеликобактерной терапии при малой обсемененности *H. pylori* превосходит по чувствительности гистологический и бактериологический методы.

Важным отличием ПЦР является то, что выделенная в процессе диагностики ДНК *H. pylori* может использоваться для определения резистентности *H. pylori* к антимикробным препаратам. Используя в качестве материала исследования биопсии слизистой оболочки желудка, можно, минуя стадию получения чистой культуры, определять мутации в гене 23S рPHK, которая ответственна за возникновение у *H. pylori* резистентности к макролидам. Обнаруженная комбинация мутаций в генах *gdxA* и *frxA* у штаммов *H. pylori*, резистентных к нитроимидазолам, позволяет определять резистентность *H. pylori* к этой группе препаратов. Однако в силу высокой стоимости такая диагностика *H. pylori* имеет скорее научное значение [1].

Неинвазивные методы диагностики *H. pylori*

Дыхательный уреазный тест

Принцип метода напоминает тот, что используется в описанном выше быстром уреазном методе. Мочевина, меченная ^{13}C , после попадания в желудок человека, инфицированного *H. pylori*, под воздействием уреазы подвергается гидролизу, в результате чего образуется углекислый газ, содержащий меченый атом углерода, который попадает в кровотоки, а затем выделяется через легкие (рис. 1).

Увеличение экскреции меченого углекислого газа в выдыхаемом воздухе используется как маркер наличия *H. pylori* в желудке. Для его определения используются масс-спектрометр или инфракрасный спектрофотометр. Данный метод может использоваться у детей и беременных женщин. Чувствительность и специфичность метода составляет 100%.

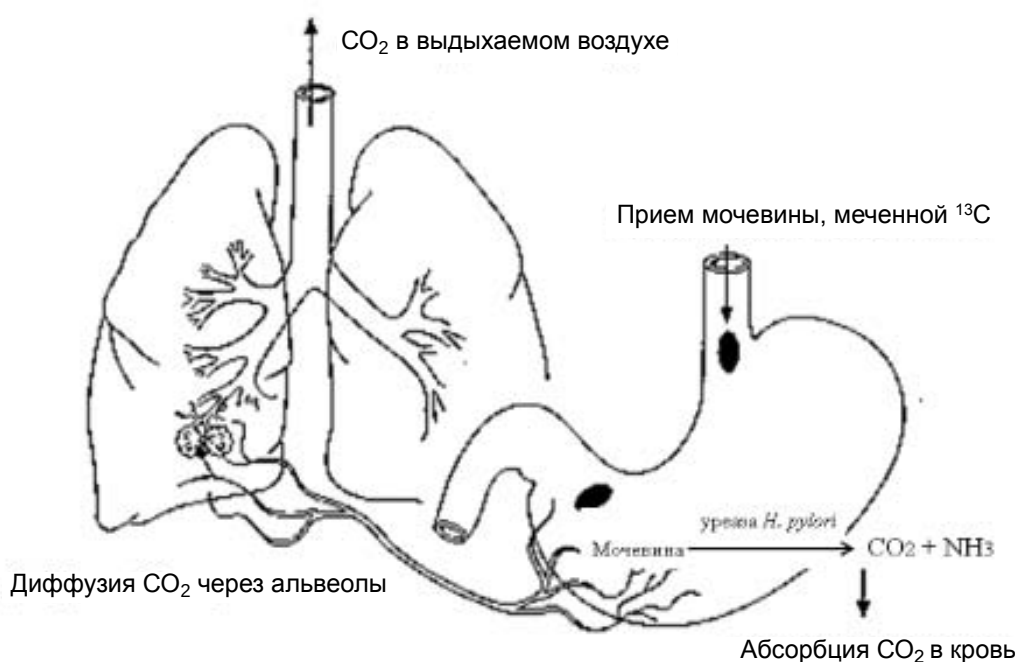


Рис. 1. Принцип действия дыхательного уреазного теста

На сегодняшний день дыхательный тест с мочевиной, меченной ^{13}C , является стандартом первичной диагностики *H. pylori* и используется для контроля за эрадикацией *H. pylori* после проведения антигеликобактерной терапии [5].

Иммунологические методы используются для определения антигенов *H. pylori* в кале и для первичной серологической диагностики *H. pylori*.

Иммуноферментный анализ концентрации антигена *H. pylori* в кале может использоваться как для первичной диагностики *H. pylori*, так и в качестве альтернативного метода для контроля эрадикации *H. pylori* через 4–6 недель. Чувствительность и специфичность данного метода в обоих случаях более 90% в сравнении с набором инвазивных методов и дыхательным тестом. Суть метода заключается в том, что на носитель нанесены антитела против антигенов *H. pylori*. При инкубации взвеси исследуемой пробы кала в плашке антигены *H. pylori* связываются с антителами, и после последующей обработки проб на стандартном фотометре и по изменению оптической плотности образца определяется концентрация антигена *H. pylori* в кале. Тест позволяет количественно оценить концентрацию антигена *H. pylori* в кале, так как не зависит от продукции метаболитов микроба, а зависит лишь от количества микробных тел в образце.

При первичной серологической диагностике инфекции *H. pylori* с помощью иммуноферментного анализа пользуются наборами для определения антигеликобактерных иммуноглобулинов класса IgG в крови. Чувствительность метода ~ 95%, специфичность ~ 86%. Уменьшение титра специфических антигеликобактерных антител наступает через 4–6 месяцев после уничтожения *H. pylori*, поэтому использовать данную методику для оценки эрадикации *H. pylori* после проведения антигеликобактерной терапии в сроки 4–6 недель не рекомендуется [6].

Молекулярно-биологические методы

ПЦР для качественного обнаружения ДНК *H. pylori* в кале в режиме реального времени является стандартом современной первичной диагностики *H. pylori* и высокочувствительным методом контроля эрадикации *H. pylori* через 4–6 недель после окончания антигеликобактерной терапии. В основе метода ПЦР лежит комплементарное достраивание ДНК матрицы, осуществляемое с помощью фермента ДНК-полимеразы. Методика проведения анализа с использованием метода ПЦР включает 3 этапа:

1 этап – выделение ДНК (РНК) из клинического образца;

2 этап – амплификация специфических фрагментов ДНК;

3 этап – детекция продуктов амплификации.

Для исследования собирают свежевыделенный кал. За 3–4 дня до исследования следует отменить

прием слабительных препаратов, прекратить введение ректальных свечей. Кал, полученный после клизмы, а также после приема бария (при рентгеновском обследовании), для исследования непригоден. Материал доставляется в лабораторию в течение 3-х часов с момента сбора анализа. При взятии материала необходимо соблюдать стерильность.

Чувствительность и специфичность определения антигена *H. pylori* ПЦР для первичной диагностики *H. pylori* и контроля эрадикации *H. pylori* превышает 90% [4].

Таким образом, неинвазивные методы диагностики *H. pylori* являются более высокочувствительными, специфичными, простыми по сравнению с инвазивными способами определения *H. pylori*, в связи с чем рекомендованы для первичной диагностики *H. pylori* и для контроля за эрадикацией *H. pylori*.

Диагностика *H. pylori* в России

Надо отметить, что проблема диагностики *H. pylori* в России чаще связана с недоступностью высокочувствительных методов определения возбудителя.

Так, по данным исследования, проведенного на базе кафедры факультетской терапии и НИИ Антимикробной химиотерапии в 2005 г., при оценке 1398 амбулаторных карт взрослых пациентов с ЯБ желудка и 12-перстной кишки в 7 регионах России (Казань, Красноярск, Москва, Новосибирск, Ростов, Санкт-Петербург, Смоленск) диагностика *H. pylori* до назначения эрадикационной терапии была проведена лишь у 22,5% (n=315) пациентов. При этом наиболее часто использовались инвазивные методы обнаружения бактерий: уреазный тест с биопсийными фрагментами – в 53% (n=161), гистологическое исследование – в 30% (n=93) и цитологическое исследование препаратов слизистой оболочки желудка – в 14% (n=45). Серологические методы использовались у 3% пациентов [2].

Контроль эрадикации *H. pylori* осуществлялся лишь у 6,7% (n=94) пациентов, т. е. у подавляющего числа больных врач не мог оценить эффективность проведенной терапии и тем более определиться с дальнейшей тактикой ведения пациента. Причем использовались в основном неадекватные методы диагностики: быстрый уреазный тест – 48%, цитологический метод – 11%, серологический метод – 3%. Адекватные неинвазивные методы диагностики *H. pylori* были проведены у очень ограниченного числа больных. У 4% пациентов определялся *H. pylori* в кале путем ПЦР, у 2% использовался уреазный дыхательный тест с мочевиной, меченной ^{13}C [2].

В настоящее время в Смоленске доступны как инвазивные методы диагностики *H. pylori* (быстрый уреазный тест, гистологический метод, определение гена *ureC* ПЦР в биоптате слизистой оболочки желудка), так и неинвазивный метод определения антигена *H. pylori* в кале ПЦР.

Использование ПЦР с целью определения *H. pylori* в кале у ограниченного числа пациентов клиники факультетской терапии на базе НИИ антимикробной химиотерапии в сентябре 2008 г. показало, что предварительный прием антибактериальных препаратов, в том числе ингибиторов протонной

помпы, накануне исследования ведет к получению ложноотрицательных результатов, что, в свою очередь требует тщательного сбора анамнеза перед назначением данного исследования. В случае отсутствия терапии до проведения диагностики *H. pylori* в кале допустимо назначение лишь антацидов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Исаков В.А., Домарадский И.В. Хеликобактериоз. – М.: ИД Медпрактика-М, 2003. – 412 с.
2. Страчунский Л.С., Ивашкин В.Т., Лапина Т.Л., Дехнич Н.Н. и др. Реальная практика ведения пациентов с язвенной болезнью желудка и 12-перстной кишки в России: результаты многоцентрового фармакоэпидемиологического исследования // Рос. журн. гастроэнтерол., гепатол., колопроктол. – 2005. - № 6. – С. 16–21.
3. Chey W.D., Wong B.C.Y. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. Am J Gastroenterol 2007. – P. 102:1808.
4. Gisbert J.P., de la Morena F., Abaira V. Accuracy of monoclonal stool antigen test for the diagnosis of *H. pylori* infection: a systematic review and meta-analysis. Am J Gastroenterol. 2006. – P. 101(8):1921–30.
5. Gisbert J.P.; Esteban C.; Jimenez I.; Moreno-Otero R. 13C-urea breath test during hospitalization for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection in peptic ulcer bleeding. *Helicobacter*. – 2007. – P. 12(3):231–7.
6. Hershko, C., Offbrand A.V., Keret D., et al. Role of autoimmune gastritis, *Helicobacter pylori* and celiac disease in refractory or unexplained iron deficiency anemia. *Haematologica* 2005. – P. 90:585.
7. Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C., Bazzoli F., El-Omar E., Graham D., Hunt R., Rokkas T., Vakil N., Kuipers E.J. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus Report. *Gut*. 2007. – P. 56(6):772–81.
8. Malfertheiner P., Megraud F., O' Morain C. Guidelines for management of *Helicobacter pylori* infection. *European gastroenterology review* 2005; 59–62.

УДК 616.36-004.34-008.7:615.382

ПРИМЕНЕНИЕ ДИСКРЕТНОГО ПЛАЗМАФЕРЕЗА В ТЕРАПИИ АЛКОГОЛЬНОГО ЦИРРОЗА ПЕЧЕНИ

Т.Г. МОРОЗОВА

Смоленская государственная медицинская академия,
кафедра госпитальной терапии

Одно из ведущих мест среди причин госпитализации и утраты трудоспособности у больных с заболеваниями органов пищеварения в возрасте от 20 до 60 лет отводится циррозу печени, который является наиболее частой причиной летальных исходов при неопухолевых заболеваниях данной локализации [3, 4]. Летальность больных циррозом печени составляет 15–25% [5]. Уровень смертности у мужчин выше, чем у женщин, в 1,5–2 раза.

Хроническая интоксикация алкоголем, по мнению многих авторов, признается наиболее частой причиной развития цирроза печени (по разным данным, от 40–50% до 70–80%) [3, 4]. В последние годы в России отмечается увеличение доли алкогольного цирроза печени в сравнении с циррозом вирусной этиологии, что связано со многими особенностями жизни населения (злоупотребление алкоголем, употребление суррогатных пищевых продуктов алкоголя, омоложение алкоголизма) [3]. Рост заболеваемости циррозом печени связан и с тем, что больные алкогольной болезнью печени чаще всего попадают

в поле зрения врача уже на стадии цирроза. Это объясняется как многолетним бессимптомным течением алкогольных поражений печени, которые прогрессируют до цирроза не более чем в 20% случаев, так и отсутствием их специфических маркеров. Велик социально-экономический ущерб, наносимый циррозом печени, так как это заболевание приводит к стойкой утрате трудоспособности, ранней инвалидности и смертности. Социальная значимость алкогольного цирроза печени обусловила его интенсивное изучение и поиск эффективной комбинированной терапии этого заболевания.

Литературные данные свидетельствуют об эффективности эфферентных методов лечения при заболеваниях печени [1, 2], в частности плазмафереза, который является самой распространенной операцией экстракорпоральной гемокоррекции, используемой в клинике внутренних болезней [4, 6]. Один из вариантов плазмафереза – дискретный (центрифужный) плазмаферез. Он нашел широкое применение в трансфузиологии при получении ком-