

Диагностика хеликобактериоза

О.Ю.Смирнов

Сумской государственный университет

Бактерия *Helicobacter pylori* рассматривается как один из основных этиологических факторов язвенной болезни и канцероген первой группы [1]. Поэтому ее выявление имеет чрезвычайное диагностическое значение. По оценкам Всемирной организации здравоохранения, излечение от *H. pylori* уменьшит количество случаев рака желудка на 60-80%, не говоря уже об экономии огромных средств на терапию [2].

Существует три основные группы методов диагностики хеликобактериоза [3, 4].

1. Методы, основанные на анализе образцов, полученных с помощью биопсии в процессе эндоскопии (при этом тем или иным способом обнаруживается непосредственно сам возбудитель). Сюда относятся и культивирование – типичный метод классической микробиологии, и анализ биоптатов на уреазную активность, и гистологическое исследование, и исследование взятого материала методами ДНК-анализа (цепной полимеразной реакции – ЦПР) или иммуноблоттинга. Их общие недостатки: а) инвазивность (биопсия); б) взятый образец может не отражать состояние всей стенки желудка (разные образцы от одного пациента дают различные результаты), т.е. не будет репрезентативным.

Удобство метода состоит в определении сразу нескольких параметров. Например, фирмы Oхoid и Creatogen предлагают быстрый (в течение 3 часов) тест для одновременной идентификации *H. pylori* и определения ее устойчивости к антибиотику кларитромицину (образец берется путем биопсии желудка) [5].

Иммунологические методы, позволяющие обнаружить антитела против возбудителя. Недостаток в том, что методы не позволяют отличать текущую инфекцию от прошедшей. Но благодаря своей простоте они находят широкое применение. Специфичность этих методов зависит от качества используемого антигена и качества цветоразрешения. Реакции выполняются в планшетах для иммунологических реакций.

Наличие в сыворотке специфических антител против *H. pylori* имеет диагностическое значение. Присутствие антител в концентрации свыше 28 Ед/мл характерно для язвы желудка и двенадцатиперстной кишки во всех возрастных группах, причем у лиц старше 50 лет концентрация уже свыше 9 Ед/мл свидетельствует о наличии язвы. Вне зависимости от возраста концентрация менее 9 Ед/мл не может указывать на наличие язв. Тест-наборы для определения в

сыворотке IgG-, IgM- и IgA-антител выпускают многие фирмы: Cambridge Life Science (Великобритания), DIESSE (Италия), INOVA Diagnostics, Biomerica и Teco Diagnostics (США), Orion Diagnostica (Финляндия) и другие [6-8]. Тестирование занимает от нескольких минут до полутора часов. Компания Meridian Bioscience (США) в 2002 г. разработала новый тест на *H. pylori*: иммунологическое определение специфического антигена бактерии (HpSA) проводится в течение 5 минут, что позволяет быстро диагностировать возбудителя и контролировать лечение [9]. Сыворотка движется по поглощающей жидкость бумажной полоске, и если в ней имеются антитела, то они связываются с нанесенной на бумагу полоской антигена, к которому присоединен краситель. Образовался комплекс антитело-антиген-краситель – появилась цветная полоса.

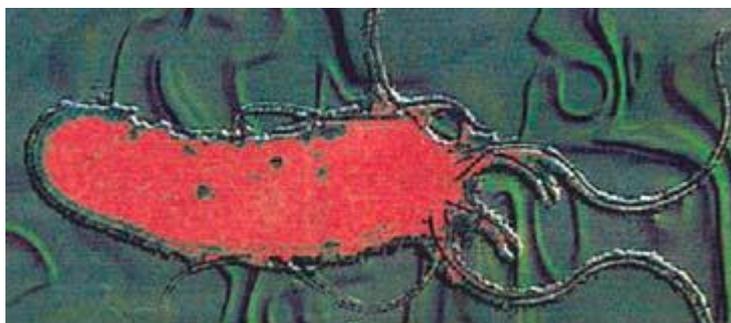


В тест-системе компании Fisher Scientific (Сингапур) [10] все классы антител к *H. pylori* определяются так: краситель (коллоидное золото) с помощью особых иммунологических реакций присоединяется к человеческим иммуноглобулинам, находящимся в исследуемом образце, и если там присутствуют какие-либо антитела к возбудителю, этот сложный комплекс в процессе хроматографии присоединяется к антигену *H. pylori*, прикрепленному к твердому носителю (подложке). В результате появляется розово-красная линия. Контрольный (положительный) образец позволяет проверить правильность выполнения теста. Чувствительность метода составляет 90%, а специфичность – 96%.

Фирма Saliva Diagnostic Systems (Великобритания) [11] выпускает тест-систему, анализирующую всего 3 мкл крови, взятой из пальца. Капиллярным наконечником пробирки, содержащей тест-полоску, прикасаются к капле крови, затем погружают его в колпачок с буферным раствором. В течение 15 мин. происходит иммунохроматография. При наличии антител к *H. pylori* появляется красная полоска. Метод имеет 100% специфичность и 98% чувствительность. Совпадение с данными биопсии – 99%. Ряд тест-систем (итальянской фирмы Radim SpA, американской Biomerica, германской R-Biopharm, бельгийской Gamma) позволяет обнаружить IgG-антитела к факторам вирулентности – белкам CagA и VacA [12-15]. Белок CagA обнаруживается у 100% больных с пептическим раком и только у 60% с гастритом.

Некоторые фирмы используют технологию ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay – твердофазный иммуноферментный анализ), основанную на взаимодействии меченных биотином антигенов (инактивированные природные антигены иммобилизованы на твердую подложку) и стрептавидина, связанного с пероксидазой; результаты готовы через 1,5 ч. Чувствительность метода 96%, специфичность 86-93% [7, 13, 16-17].

Обычно концентрация IgG в слюне – менее 1% от уровня антител в сыворотке, поэтому, в принципе, достаточно чувствительный тест может использоваться для выявления антител в слюне (т.е. избегая инвазивных процедур). Фирма Ani Biotech Oy (Финляндия) разработала быстрый метод обнаружения антител в слюне [18]. Одностадийная иммунохроматографическая процедура может выполняться дома самим пациентом: слюна отбирается палочкой с ватным тампоном (условие – не пить за 2 часа до взятия пробы, чтобы не изменился состав слюны), тампон переносится в специальную пробирку, и слюна диффундирует в реакционную жидкость, содержащую буфер для компенсации отклонений в pH слюны. По изменению цвета делается соответствующий вывод. Специфичность метода 95%, чувствительность 98,2%, точность 96,3%.



3. **Дыхательный тест**, он же уреазный тест, он же метод "мочевина + дыхание" (urea breath test, УБТ) – весьма чувствительный, определяет наличие возбудителя именно в данный момент, и потому наиболее подходит для мониторинговой

терапии [19, 20]. Он основан на определении уреазной активности. Больной проглатывает ^{13}C -меченую мочевины ($\text{H}_2\text{N}^{13}\text{CONH}_2$), которая усваивается бактерией благодаря ферменту уреазе. Образовавшийся меченый углекислый газ поступает в кровь и затем выделяется при дыхании. Если отбирать каждые 10 мин. пробы выдыхаемого воздуха и оценивать соотношение $^{13}\text{CO}_2/^{12}\text{CO}_2$, можно обнаружить, что рост кривой начинается через 10 мин., пик $^{13}\text{CO}_2$ достигается через 30 мин., а падение происходит через 60. В анализируемой пробе воздуха молекулы CO_2 автоматически отделяются от N_2 и O_2 , затем ионизируются и ускоряются, поступая в анализатор. В магнитном поле траектории молекул с разным молекулярным весом различаются, позволяя провести анализ соотношения изотопов. Десять мл воздуха отбираются перед приемом мочевины, затем 10 мл спустя 30 мин., и обе пробы анализируются. По разным данным, специфичность метода 98-98,5%, чувствительность 97,9-100%, что сравнимо с традиционными инвазивными методами эндоскопии.

Недостаток метода состоит в том, что требуется наличие соответствующего прибора – масс-спектрометра, определяющего соотношение изотопов [21, 22]. Цена этих приборов такова, что они имеются главным образом в центральных учреждениях, а, следовательно, образцы для анализа нужно транспортировать, пациент же должен ждать результата. Преимущество – в том, что масс-спектрометры позволяют одновременно анализировать 160-200 проб, причем результаты выдаются через 1-2 мин.

Вообще методы анализа выдыхаемого воздуха позволяют обнаружить усиленный рост бактерий, опорожнение желудка, толерантность к глюкозе (ее переносимость), непереносимость лактозы, дисфункции печени и нарушения деятельности поджелудочной железы.

Наконец, недавно появился новый (4-й) оригинальный метод диагностики: итальянская фирма Meridian Diagnostics [9] и английская Intersep [23] разработали тест-систему для иммунологического обнаружения антигенов HpSA *Helicobacter pylori* в свежих или замороженных образцах кала в одну стадию. Метод позволяет подтвердить наличие инфекции и не дает ложноположительных результатов, встречающихся при анализе сыворотки пациентов, которые имели заболевание в прошлом. Метод хорошо коррелирует с УВТ и инвазивными методами. Результат готов через 75 мин. Этим методом недавно был выявлен старейший диагностированный случай хеликобактериоза. Д-р Pelayo Correa с помощью теста на основе платины обнаружил фекальные антигены *Helicobacter pylori* в доколумбовых мумиях 1700-летнего возраста, получив доказательство самого древнего случая заражения человека этим микробом. Используемый им метод обнаруживает антигены возбудителя язвенной болезни в свежем или замороженном кале менее чем за 90 минут. Показатели чувствительности и

специфичности метода – по 96% (для сравнения: у метода UBT – 90-96% и 90-98%, у биопсии – 80-98% и 95-100% соответственно).

Литература

1. International Agency for Cancer Research. Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. IARC: Lyon, 1994:61
2. The role of diagnostic tests in reducing healthcare costs // Clinical Laboratory International, 8 (2001).
3. Urea for breath testing for the detection of *Helicobacter pylori* // Clin. Lab. Int., 4 (1998).
4. The link between *H. pylori* and gastric cancer // Clin. Lab. Int., 3 (2000).
5. Rapid and reliable test for the simultaneous identification of *H. pylori* and its sensitivity towards macrolids // Clin. Lab. Int., 3 (2000).
6. Antibodies to *H. pylori* detected by rapid, one-step test // Clin. Lab. Int., 1 (1998).
7. ELISA for *H. pylori* Abs measure the three main isotypes // Clin. Lab. Int., 4 (1997).
8. *H. pylori* ELISA for serum or plasma // Clin. Lab. Int., 3 (2000).
9. www.meridianbioscience.com
10. Rapid test for *H. pylori* detects all classes of antibodies to *H. pylori* // Clin. Lab. Int., 6 (1999).
11. Test for antibodies to *H. pylori* suitable for the use at point of care // Clin. Lab. Int., 1 (1998).
12. Cytotoxin associated gene A (CagA) ELISA allows identification of *H. pylori* patients at higher risk of carcinoma // Clin. Lab. Int., 5 (1999).
13. Western blot for *H. pylori* // Clin. Lab. Int., 4 (1997).
14. IgG antibodies to *H. pylori* CagA antigen quantitated through use of a highly specific automated ELISA test // Clin. Lab. Int., 7 (1997).
15. Rapid test for Abs to *H. pylori* uses HSP60 and CagA recombinant antigens // Clin. Lab. Int., 7 (1999).
16. Quantitative ELISA test for *H. pylori* IgG antibodies // Clin. Lab. Int., 1 (1998).
17. ELISA for IgG to *H. pylori* // Clin. Lab. Int., 7 (1998).
18. *H. pylori* antibodies in saliva determined by rapid test // Clin. Lab. Int., 1 (1999).
19. ¹³C-Urea breath test for the detection of *H. pylori* approved by European authorities // Clin. Lab. Int., 1 (1998).
20. Analyser of ¹³C in breath for detection of gastric bacterial infection // Clin. Lab. Int., 1 (1998).
21. Fully automated ¹³C UBT mass spectrometer for the diagnosis of *Helicobacter pylori* infection // Clin. Lab. Int., 1 (1998).
22. Compact isotope ratio mass spectrometer designed specially for urea breath test of *Helicobacter pylori* // Clin. Lab. Int., 1 (1999).
23. *H. pylori* immunoassay for stool samples // Clin. Lab. Int., 3 (2000).

24. The oldest diagnosed case of *H. pylori* and the definitive new test that detected it
HpSA // Clin. Lab. Int., 7 (1998).