

Н. PYLORI - ИДЕНТИФИКАЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ, МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ, ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ (ПО МАТЕРИАЛАМ ЕВРОПЕЙСКОГО КОНГРЕССА 1998 г.). НИЗКОЗАТРАТНЫЕ МЕТОДЫ ВЫДЕЛЕНИЯ Н. PYLORI

Скугина Н.П.

H. pylori (Н.р.) впервые были обнаружены в 1893 году G.BiLLI его на поверхности слизистой оболочки желудка в виде спиралевидных микроорганизмов, чему в то время не придали никакого значения. И только через 100 лет, в 1983 году австралийские ученые В.Marshall и J.Warren произвели революцию в гастроэнтерологии, в корне изменив представление об этиологии гастрита и язвенной болезни, выделив, культивировав и описав новый микроорганизм - *Campylobacter pilory*.

В настоящее время доказана неоспоримая связь между наличием в антральном отделе слизистой оболочки желудка бактерий Н.р. и возникновением и рецидивированием практически 100% язвенной болезни луковицы двенадцатиперстной кишки и более 70% язвенной болезни желудка. При эрозивных гастритах Н.р. выделяется в 100% случаев, при острых - в 95%, хронических гастритах - 62% случаев. Ряд зарубежных авторов отмечают взаимосвязь между Н.р-инфекцией и возможностью развития рака желудка (G.Chira и соав., Martin de Argila и соав., М.Менегатти и соав.).

В настоящее время Н.р. выделен в отдельный род *Helicobacter*. Это неспорообразующие gr(-) изогнутые бактерии S- или V-образной формы или в виде крыльев летящей чайки с закрученными концами, длиной 2,5-5,0 мкм, диаметром 0,5-1,0 мкм, они снабжены 1 или 5-6 жгутиками с чехлом, расположенными на одном или обоих полюсах клетки. Движение клеток быстрое и стремительное. Лучше растут в микроаэрофильных условиях на кровяной среде, шоколадном агаре, на СМВ-агаре с древесным углем и кукурузным крахмалом. Оптимальный состав газовой смеси 85-87% - N₂, O₂ - 5%, CO₂ - 8-10%. В строго анаэробных и аэробных условиях рост варьируется. Оптимальная температура роста 37°. Растут в присутствии 0,5% глицерина и 0,04% трифенилтетразолийхлорида. В присутствии 3,5% NaCl не растут. Каталазо- и оксидазоположительные образуют H₂S, не редуцируют нитраты в нитриты и не образуют индол, не ферментируют глюкозу. У многих культур обнаружена гемолитическая активность, но не выявлена способность гидролизовать гипурат. Продуцируют большое количество фермента уреазы. Плохо окрашиваются по Граму.

При изменении температуры, pH, в старых культурах образуют коковидные формы. Очень требовательны к питательным средам. В питатель-

ные среды должны входить вещества, поддерживающие окислительно-восстановительный потенциал среды, такие как пируват Na, сульфит Fe, тиосульфит Na и др.

Патогенность Н.р. определяется рядом факторов: выделяющийся Н.р фермент уреазы разлагает мочевину, находящуюся в желудке до CO_2 и аммиака, который нейтрализует рН желудочного сока, вызывает локальное защелачивание вокруг бактериальной клетки, обеспечивая ей условия для существования. С другой стороны, изменение рН желудочного содержимого приводит к обратной диффузии H^+ ионов через слизистую оболочку желудка, что вызывает гипохлоргидрию, которая является предрасполагающим фактором для образования язвы желудка. Сам фермент уреазы деструктивно действует на эпителий, а повышение концентрации аммиака вызывает некротические повреждения слизистой оболочки желудка.

Протеолитические ферменты Н.р. протеазы разрушают муцин эпителиального слоя, липазы разрушают липиды и фосфолипиды гастрального эпителия, фермент ДНК-аза нарушает синтез белка. Все это снижает барьерные свойства желудочного сока, приводит к разрушению слизистого слоя желудка, способствует адгезии и колонизации возбудителя. Способствует изъязвлению и выделяющийся Н.р фермент - цитотоксин.

Инвазия Н.р. приводит к нарушению процесса клеточного обновления эпителия - апоптоза. Апоптоз (листопад) - физиологический процесс гибели клеток, завершивших свой жизненный путь и клеток с генетическими повреждениями, которые захватываются макрофагами и здоровыми клетками эпителия (тканевой гомеостаз). При геликобактериозном гастрите апоптотическая активность возрастает в 5-6 раз. Длительная пролиферация сопровождается появлением клеток, устойчивых к апоптозу, что ведет к росту ткани и развитию опухоли.

Н.р. вызывает образование аутоиммунных антител вследствие свойственной ему мимикрии. У Н.р. идентичные со слизистой оболочкой желудка антигены и при колонизации Н.р. организм начинает вырабатывать антитела против собственных клеток. Развивается аутоиммунный гастрит.

Н.р. стимулируют нейтрофильные полинуклеиды, провоцируя острую воспалительную реакцию.

Пути передачи Н.р.-инфекции окончательно не установлены. Наиболее достоверный из них - оральный, непосредственный фекально-оральный путь или через предметы при длительном контакте от человека к человеку, так называемый семейный фактор.

Факторы риска развития Н.р.-инфекции: черная раса, испанская национальность, старение, мужской пол, курение, употребление сырой воды. Определяющее влияние на развитие инфекции оказывают социально-экономические условия. Так, в экономически развитых странах, в семьях с хорошим достатком, с хорошо развитыми санитарно-гигиеническими навыками уровень инфицирования ниже (США, Англия - 30-40%), чем в странах с

неразвитой экономикой (Бенин - 84%, Россия - 60-70%). В связи с тем, что при Н.р.-инфекции не всегда удается выявить отчетливо выраженных клинических симптомов заболевания желудка, особое значение придается методам лабораторной диагностики.

Методы лабораторной диагностики Н.р. можно разделить на прямые и косвенные, инвазивные и неинвазивные, "быстрые" (оценка результата в течение нескольких минут или часов) и "суточные" (оценка результата через сутки). Прямыми методами обнаруживают непосредственно самого возбудителя. Косвенные доказательства основываются на биохимических и иммунологических свойствах бактерий.

К неинвазивным методам диагностики Н.р. относятся:

1. Уреазный дыхательный тест. Основан на способности Н.р. гидролизовать мочевины до CO_2 и NH_3 . Больной принимает меченую изотопом ^{14}C или ^{13}C мочевины и образующийся при ее расщеплении CO_2 фиксируется через 20 мин. с помощью масс-спектрографа. Другой дыхательный тест, разработанный в Санкт-Петербурге ("Аэротест"), основывается на регистрации в выдыхаемом воздухе NH_3 с помощью линейного газоанализатора. Чувствительность метода высокая до 95%, у детей до 100%, но с его помощью нельзя провести дифференциальную диагностику с пептической язвой и неязвенной диспепсией. Снижение обсеменения Н.р. в слизистой оболочке после эрадикации приводит к ложноотрицательным результатам дыхательного теста в 38,5% случаев.

2. Серологическая диагностика основана на способности Н.р. проявлять как локальную, так и системную иммунологическую реакцию. Методы эффективны при эпидемиологических и скрининговых обследованиях. Используют РСК (реакция связывания комплемента с диагностическим титром 1:16, 1:32), РА (диагностический титр 1:40), РНГА (1:320, 1:5120).

3. ИФА (иммуноферментный анализ) - метод определения специфических для Н.р. антител, относящихся к иммуноглобулинам классов А, G, М. Наиболее достоверным в последнее время считается определение антител класса IgE. Чувствительность метода 88%, специфичность 89%, но с помощью этого метода нельзя контролировать немедленный эффект от антибактериальной терапии, т.к. снижение титров антител наступает не ранее, чем через 6-9 месяцев после лечения.

4. Вспомогательные иммунологические методы. У больных отмечаются изменения в системе клеточного иммунитета. В острой фазе наблюдается уменьшение числа Т-лимфоцитов, увеличение числа В-лимфоцитов, некоторое повышение супрессорной функции лимфоцитов и незначительное снижение их хелперной активности. После достижения рубцевания язвы имеется положительная динамика этих показателей: увеличивается число Т-лимфоцитов, уменьшается их супрессорная функция и увеличивается хелперная. Количество Т- и В-лимфоцитов в периферической крови может быть определено методом розеткообразования. Изменения в иммунной системе у

больных с язвенной болезнью желудка при наличии Н.р. в зоне язвы сопровождаются нарушениями в системе неспецифической защиты (лизоцим, комплемент), что может быть определено реакциями иммунного лизиса.

5. Вспомогательный метод УЗИ. Ультразвуковые признаки Н.р.-инфекции - образование слоистости, уплотнение стенок желудка, увеличение объема желудочного секрета натощак более 30 мл.

6. Способ обнаружения Н.р. путем бактериоскопии осадка порции желудочного сока. Полученную натощак порцию желудочного сока центрифугируют при 3-4 тыс/обор. в течение 30-40 мин. Из осадка готовят препарат путем распределения 0,01 мл на площадь диаметром 10 мм. Высушивают, окрашивают по Гимзе с последующей бактериоскопией при увеличении 900 и подсчетом Н.р. В случаях обнаружения Н.р.: до 20 бактериальных клеток считается обсеменением легкой степени (+), до 50 бактерий - обсеменение средней степени (++), и, наконец, при обсеменении более 50 бактерий в поле зрения - обсеменение высокой степени (+++). Информативность метода у больных с язвенной болезнью желудка в стадии обострения 93±8%, у детей с хроническим гастритом - 67±3% (В.Г.Дорофейчук). Метод не требует дорогостоящего оборудования и реактивов. Инвазивные методы обнаружения Н.р. остаются на сегодняшний день более достоверными, предусматривают проведение эзофагогастродуоденоскопии с последующей биопсией слизистой оболочки антрального, пилорического отделов или угла желудка. Полученные биоптаты исследуют на наличие Н.р.

1. Культуральный метод - метод получения чистой культуры. Н.р. выращивают на питательных средах в микроаэрофильных условиях (N₂ - 85%, CO₂ - 10%, O₂ - 5%), при повышенной влажности и температуре 37°. В состав питательных сред вводят специальные азототолерантные добавки. За рубежом - это Скиффроу и Баулера, в России на 1 литр добавляется 5% дифбригинированной человеческой крови, 2,5% гемолизированной крови, 125 мг Fe₂SO₃, 5 гр. ристоминина. На плотных питательных средах (в качестве основы берется эритрит-агар, лучше железосульфитный агар) через 5-7 дней вырастают Н.р. в виде мелких (1-2 мм), полупрозрачных неокрашенных колоний. Биохимические свойства сравнивают по определителю бактерий Биружи. Для видовой идентификации с кампилобактерами можно использовать температурные тесты (табл. 1).

Таблица 1

Температурные тесты для видовой идентификации бактерий рода кампилобактер

Виды	Каталаза	Рост при температуре				Наличие к-та 30 мкр на 1 мл	Уреаза
		25°	30°	37°	42°		
<i>C.fetus</i>	+	+	+	+	-	y	-
<i>C.jejuni</i>	+	-	-	+	+	z	-
<i>C.coli</i>	+	-	+	+	+	z	-
<i>H.pylori</i>	+	-	+	+	+	y	+

Условные обозначения: у - устойчивость, z - чувствительность

Частота выделения Н.р при культуральном методе 75-90%. Преимущество метода в том, что он обеспечивает получение антибиотикограммы.

2. "Золотым стандартом" обнаружения Н.р на сегодняшний день считается гистологический метод - окрашивание 2-3 биоптатов, полученных из слизистой оболочки желудка телуридиновым синим или серебром. Чувствительность метода и специфичность 89-97%. Метод удобен тем, что помимо Н.р-статуса можно дать оценку состояния слизистой оболочки желудка.

К быстрым методам обнаружения Н.р относятся методы иммунофлюоресценции с использованием моноклональных антител на раздавленном препарате. Результат их может быть получен во время эндоскопии или спустя 24 часа.

Все большее распространение начинает получать ПЦР, определяющая ДНК Н.р. в слизистой оболочке желудка и являющаяся точным, прямым методом обнаружения микроба. Имеет высокую специфичность и большую чувствительность по сравнению с уреазными тестами, получением чистой культуры и гистологическим методом.

Широкое распространение во врачебной практике получили биохимические уреазные тесты. Принцип метода: в пробирку с мочевиной и индикатором (чаще феноловым красным) помещается биоптат. При наличии Н.р мочевина разлагается, изменяется рН среды и ее окраска первоначально желтая приобретает малиново-красный цвет. В настоящее время из уреазных тестов используют: де-нол-тест ("быстрый" тест - результат читается в период от 1 мин до 1 часа; в среднем через 20 минут), GLO-тест, Самри-тест, среду Христенсена ("суточные" тесты - результаты считываются через 24 часа). Чувствительность и специфичность этих тестов высока (табл 2).

Таблица 2

Чувствительность и специфичность уреазных тестов в сравнении

Уреазный тест	Чувствительность %	Специфичность %
Среда Христенсена	92	99,4
CLO - тест	99	100
Самри - тест	98	100
Де-нол-тест	95	100

"Быстрые" тесты имеют несколько низкую чувствительность по сравнению с "суточными".

К будущим неинвазивным методам обнаружения Н.р. будет относиться, предложенный M. Notimicola и соавт., способ обнаружения ДНК Н.р в кале (ПЦР) и выделение Н.руlogi из фекалий человека после центрифугирования в микроаэрофильных условиях. Этот потенциально неинвазивный метод

необходимо совершенствовать. В настоящее время информативность его 50%

Идеального метода диагностики Н.р. пока не разработано. В большинстве случаев точная диагностика основана на сочетании нескольких применяемых тестов. Европейская группа по изучению Н.р. настоятельно рекомендует для обнаружения Н.р. использовать не менее двух разных методов диагностики.

В ДГКМБ № 9 для обнаружения Н.р. инвазивный экспресс-метод определения уреазной активности у Н.р. Для точной диагностики, согласно рекомендации экспертов ВОЗ, применялось два метода:

- 1) бактериоскопический
- 2) определения уреазной активности.

Объектами исследования являются биопаты слизистой оболочки, чаще антрального и реже пилорического отдела желудка.

Для доставки биопатов в лабораторию используются сухие, стерильные центрифужные пробирки с ватно-марлевой пробкой. Доставка и хранение биопатов осуществляется на холоду (в контейнере со льдом). В лаборатории из биопатов делаются мазки-отпечатки на стерильные стекла. Остальной материал гомогенизируется петлей и засеивается в 0,2 мл 2% водного раствора мочевины с индикатором метил-рот и на сектор Среды Ка и Эндо (для контроля роста других уреазноположительных микроорганизмов). Третьим контролем служит незасеянная пробирка с 0,2 мл 2% водного раствора мочевины с индикатором метил-рот.

Пробирки ставят в маленький штатив и помещают в полиэтиленовый мешок, который наполняется повсрочной смесью газа (5% - O₂, 10% - CO₂, 85% - N₂), завязывается и помещается в термостат при 37 градусов. Для создания влажных условий в мешок помещают чашку Петри с водой. Просмотр осуществляется предварительно через 2 часа, окончательно через 24 часа, т.е. на следующий день.

При положительном тесте наблюдается розовое окрашивание разной интенсивности, которое наступает через несколько минут, часов или на следующий день в зависимости от количества Н.р. в биопате.

В мазках-отпечатках, окрашенных по методу Май-Грюнвальда, на голубом фоне слизи находят характерные по морфологии изогнутые палочки фиолетового цвета.

Нами было обследовано 120 биопатов слизистой оболочки желудка у детей 7-14 лет с диагнозом: хронический гастрит, хронический гастродуоденит. В 65% случаев была установлена геликобактериозная этиология заболевания. Для сравнения использовался ИФА метод с обнаружением специфических антител класса IgG на базе центра диагностики инфекционной заболеваемости. Положительные титры были выявлены у 76% больных.

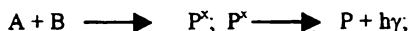
Таким образом, и метод ИФА тоже дает часто положительные результаты. Хотя гистологический метод является более специфичным и чувствительным.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА В ДИАГНОСТИКЕ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Курдюкова Т.Н.

Выявление специфического аллергена является одним из важных и необходимых исследований в диагностике аллергических заболеваний.

С 1992 года в ДГКМБ № 9 проводится определение специфических сенсибилизирующих аллергенов методом хемилюминесцентного анализа. Хемилюминесцентный анализ (ХЛ) основан на регистрации свечения в видимой области спектра, возникающего в ходе химических реакций, сопряженных с переходом элекстроно возбужденного продукта в основное состояние с выделением кванта света:



где: A, B – субстрат реакция;

P^x , P – продукт в возбужденном и основном состоянии соответственно;

$h\nu$ - квант света.

Концентрацию анализируемого вещества определяют по светосумме ХЛ либо по скорости интенсивности излучения. ХЛ-анализ отличается высокой чувствительностью даже среди биофизических методов, не требует дорогостоящих и дефицитных реактивов, сложной аппаратуры. Более того, он открывает принципиально новые оригинальные возможности, например, определения *степени активности живых клеток*. Исследования, проводимые в лаборатории ДГКМБ № 9, выполнены на серийном хемилюминометре медицинском ПХЛ-01.

Принципы хемилюминесцентного анализа

Было отмечено, что генерация активных форм кислорода клетками сопровождается слабым свечением. Эта нативная хемилюминесценция обладает очень низкой интенсивностью и ее практически невозможно использовать для количественной оценки процесса метаболической активности клеток. Однако продукция света в суспензии клеток может быть усилена при введении такого соединения как люминол (5-амино-2, 3-дигидро-1, 4-фталазидион).

Люминол взаимодействует с активным кислородом, продуцирует большие количества света со спектральным максимумом 425 нм.