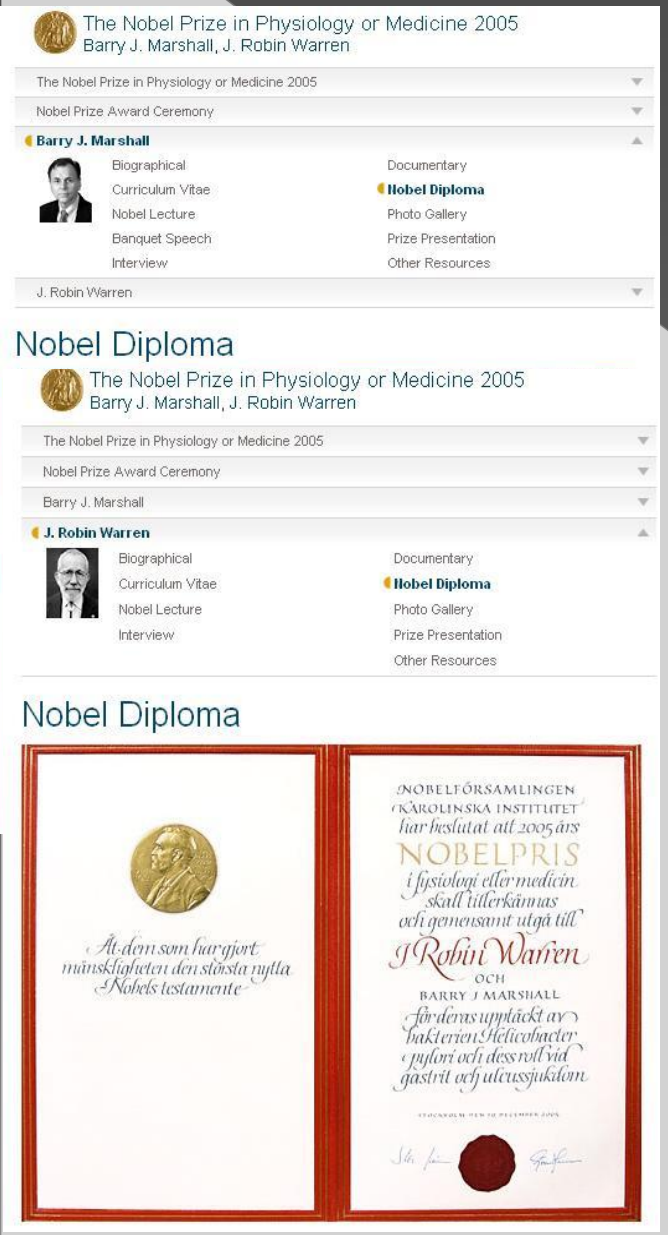
СОВЕРШЕНСТВОВАНИЕ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИИ HELICOBACTER PYLORI

ВЕРДИКТ НОБЕЛЕВСКОГО КОМИТЕТА: ХЕЛИКОБАКТЕР ЯЗВА ЖЕЛУДКА ЭТО СЕРЬЕЗНО !

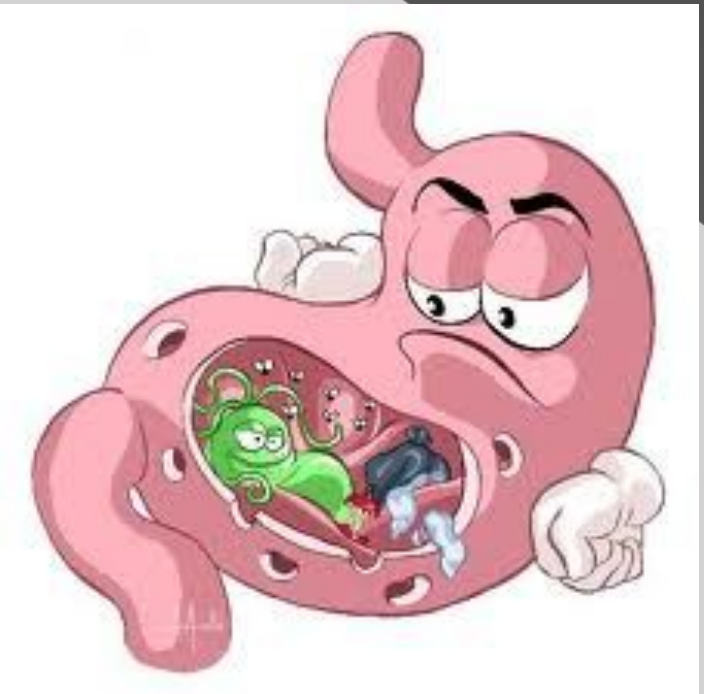


Гастрит оми язвенной болезнью желудка и 12-перстной кишки страдают многие. Они возникает по разным причинам, но лишь недавно стало известно о том, что важнейшим этиологическим фактором болезни является бактерия Helicobacter pylori. За это открытие, сделанное в 1982 г., австралийские ученые Б. Маршалл и Р.Варрен получили в 2005 г. саму. Престижную премию планеты в области медицины -Нобелевскую премию.

Наши знания о хеликобактериозе, методах диагностики и борьбы с этой инфекцией быстро растут. Задача их обобщения и возложена на Европейский и национальные комитеты по изучению H.pylori. Российский комитет начал свою работу в 1995 г.

Для внедрения научно-практических достижений национальные комитеты регулярно выпускают консенсусы «Маастрихт»: 1996, 2000 и 2005 гг.

НЕТ ПРАВИЛ БЕЗ ИСКЛЮЧЕНИЙ!

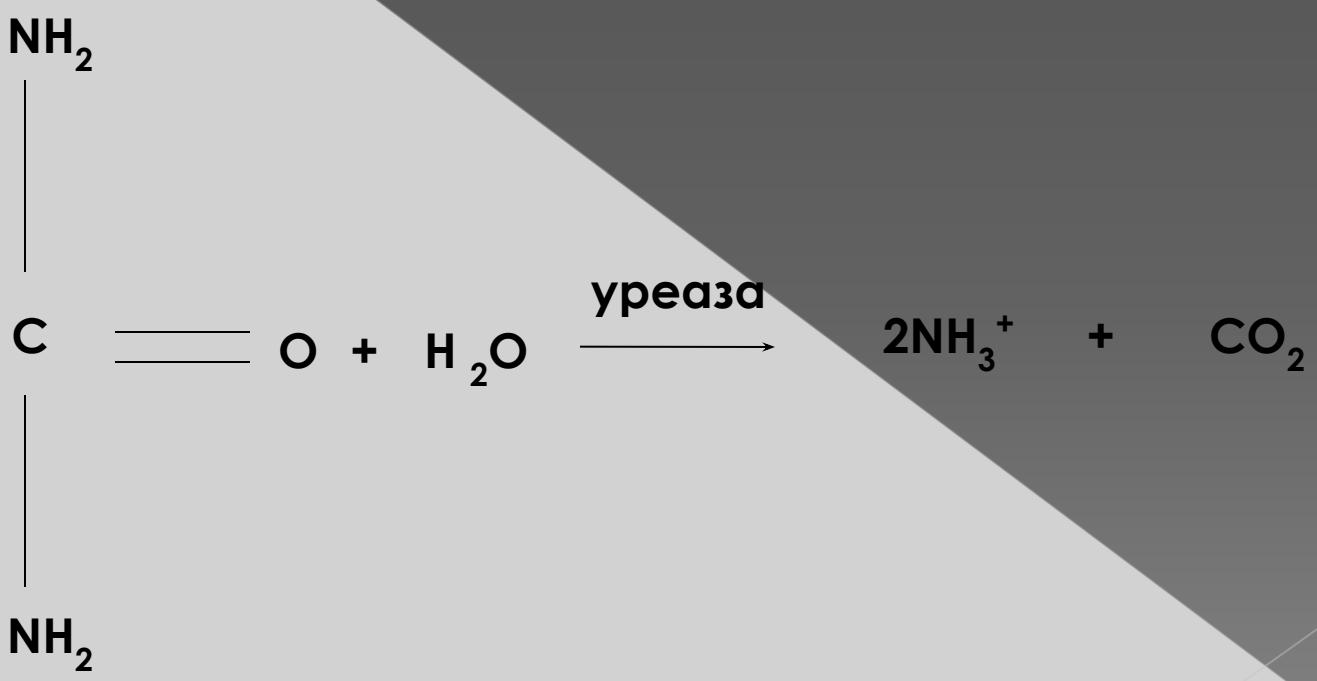


Желудок является тем «**чистилищем**», в котором в условиях воздействия соляной кислоты и протеолитических ферментов наряду с перевариванием пищи происходит разрушение, попавших в организм микроорганизмов. В справедливости такой точки зрения не приходится сомневаться, но хеликобактерии исключение из этих правил: они не только не погибают в кислой среде, но и способны в ней размножаться.

Как это им удается?

МЕХАНИЗМЫ ВЫЖИВАНИЯ ХЕЛИКОБАКТЕРИЙ

Хеликобактерии приобрели способность интенсивно синтезировать уреазу, благодаря чему соляная кислота желудочного сока перестала представлять для них опасность.



Образование аммония ведет к повышению pH

ДРУГИЕ ФАКТОРЫ ПАТОГЕННОСТИ

В колонизации десен, кариесных полостей зубов, желудка, кишечника (в т.ч. и толстого) хеликобактериям помогают и другие факторы патогенности:

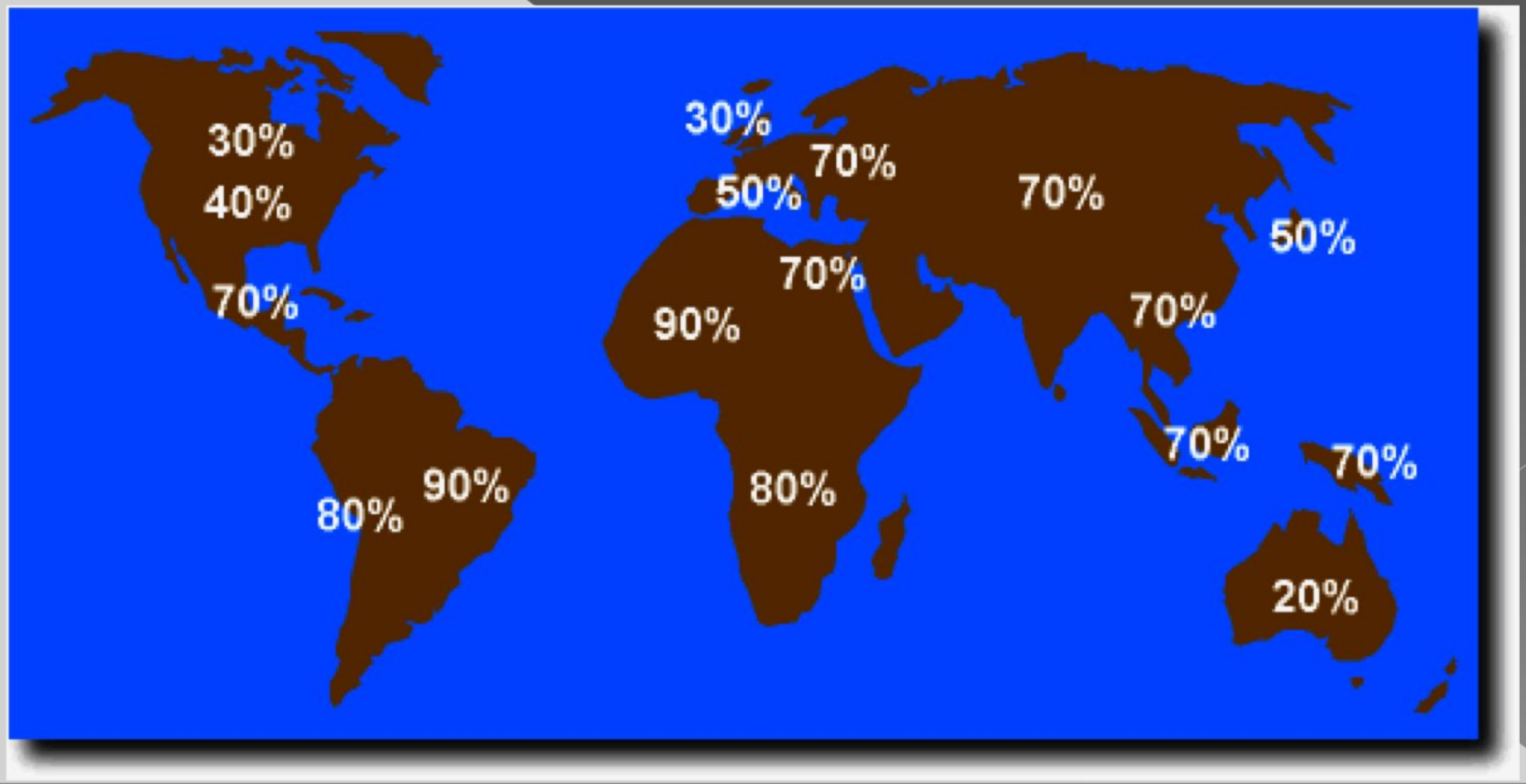
1. **Подвижность** (винтообразно-спиральная форма и жгутики позволяет перемещаться в вязкой пристеночной слизи желудка.
2. **Образование биопленки.**
3. **Способность инвазировать** клетки слизистой оболочки желудка.
4. **Каталаза, супероксид дисмутаза и антиген VacA** защищают от фагоцитов и свободных радикалов.
5. **Фосфолипаза, глюкозофосфатаза и муциназа** способствуют преодолению барьеров слизистой оболочки.
6. **Адгезины** (поверхностные белки Hop (BabA, SabA, OipA, AlpA и AlpB) обеспечивают прикреплениеми к эпителиальным клеткам, ассоциированы с метаплазией и онкологическим процессоминтенсивное образование SabA - с метаплазией и онкологическим процессом.
7. **Цитотоксины** вызывают лизис эпителия и образование эрозий.

НАИБОЛЕЕ ПАТОГЕННЫЕ ДЛЯ ЧЕЛОВЕКА ХБ

Вид	Резервуар	Вызываемые у людей болезни	Инцидентность
H.pylori	Человек, обезьяны, свинья	Гастрит, язвы желудка и 12перстной кишки, опухоли желудка	Высокая
H.cinaedi	Человек, хомяк	Гастроэнтерит, септицемия, проктоколит, целлюлит	Низкая
H.fennelidae	Человек	Гастроэнтерит, септицемия, проктоколит	Низкая
H.canis	Собака	Гастроэнтерит	Очень низкая
H.pullorum	Птицы	Гастроэнтерит	Очень низкая
H.rappini	Человек, овца, мышь	Гастроэнтерит	Очень низкая
H.canadensis	Человек	Гастроэнтерит	Очень низкая

РАСПРОСТРАНЕНИЕ ХЕЛИКОБАКТЕРИОЗА

Инфекция широко распространена практически по всей планете и ее инцидентность варьирует в разных (в возрастном и этническом аспектах) группах населения. В развитых странах ее инцидентность достигает 40-50%, а в развивающихся — 70-90%.



ПУТИ ПЕРЕДАЧИ ИНФЕКЦИИ

Заражение хеликобактериями происходит 3 способами:

— **фекально-оральным** (через контаминированные фекалиями воду, продукты питания и пр.

— **орально-оральный** (через слюну)

— **ятрогенным** (при эндоскопии и зондировании желудка/12-перстной кишки, лечении зубов).

Во внешней среде хеликобактерии быстро погибают из-за повышенной чувствительности к кислороду и неспособности образовывать споры.

КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

Колонизация хеликобактериями пристеночной слизи желудка часто не ведет на протяжении длительного времени к патологическим изменениям этого органа и общего клинического состояния человека. При проведении антимикробной терапии популяция этих бактерий может снижаться вплоть до полной элиминации.

В условиях воздействия стресс-факторов, при нарушениях питания, снижении иммунитета (спонтанном и в результате применения иммунодепрессантов) возрастают тяжесть инфекции и ее осложнений (**хронических диспепсии и гастрита, язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки, опухолей желудка**).

Быть инфицированным хеликобактериями также опасно, как ходить по заминированной территории.

ПОСЛЕДСТВИЯ ХЕЛИКОБАКТЕРИОЗА

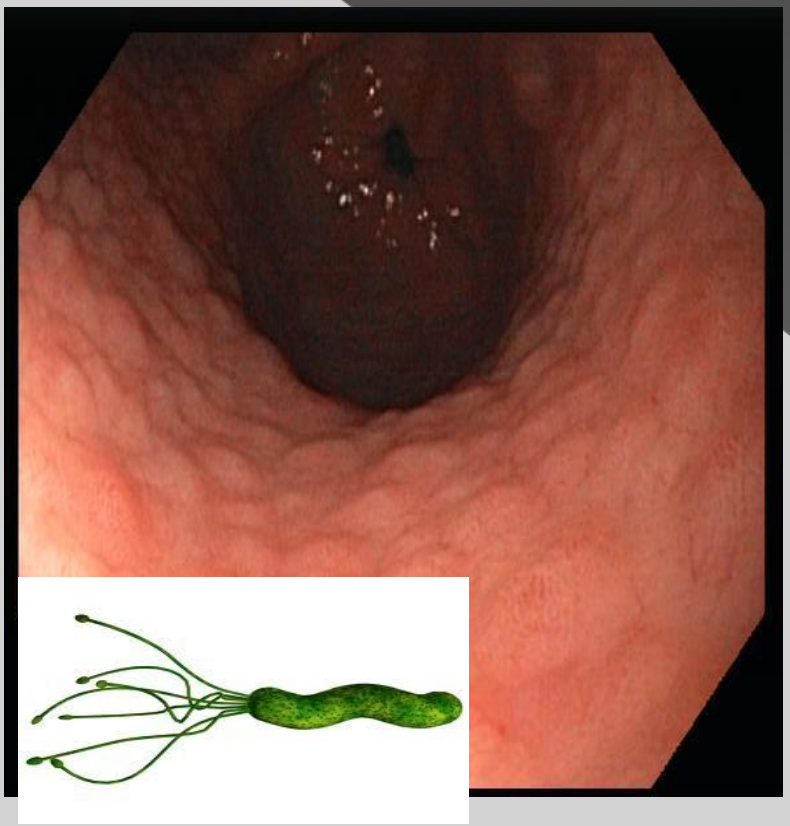
Хеликобактериоз ная инфекция не только опасна для жизни и здоровья людей, но и приносит **значительный экономический ущерб.**

По данным американских ссследователей, в США ежегодно только на лечение пациентов с язвенной болезнью желудка и 12-перстной кишки тратится 6 млрд. долларов*. Эта цифра стала бы значительно больше при учете других последствий инфекции, а также расходов на ее диагностику.

Инцидентность реинфекции хеликобактерий у пациентов после антимикробной терапии колеблется от 1 до 3%.

* Sonnenberg A et al. *Am J Gastroenterol 1997;92:614-620*

ДИАГНОСТИКА – ОСНОВА БОРЬБЫ С ХЕЛИКОБАКТЕРИОЗОМ



Биологические свойства хеликобактерий и особенности вызываемых ими инфекций затрудняют борьбу с ними, которая при отсутствии средств специфической профилактики (а работа в этом направлении ведется) основана на выявлении инфицированных людей, проведении их антимикробной терапии и последующей проверки полноты эрадикации возбудителя из слизистой оболочки пищеварительного тракта.

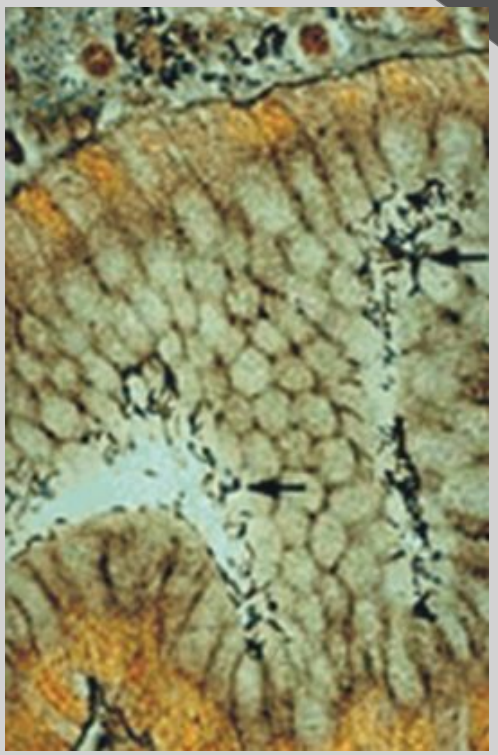
От надежности применяемых методов диагностики зависит эффективность борьбы с хеликобактериозом (ХБ).

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ

Первичная постановка диагноза основана на выявлении бактерии или продуктов ее жизнедеятельности в :

Биоптатах	**Пробах, полученного неинвазивными способами**
- Изоляция возбудителя на питательных средах - Фазово-контрастная микроскопия - Гистологический метод - Быстрый уреазный тест - ПЦР	- Обнаружение антител к возбудителю в крови, слюне, моче - Обнаружение антигенов возбудителя в фекалиях - Уреазный дыхательный тест - ПЦР (фекалии, слюна)

ГИСТОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД



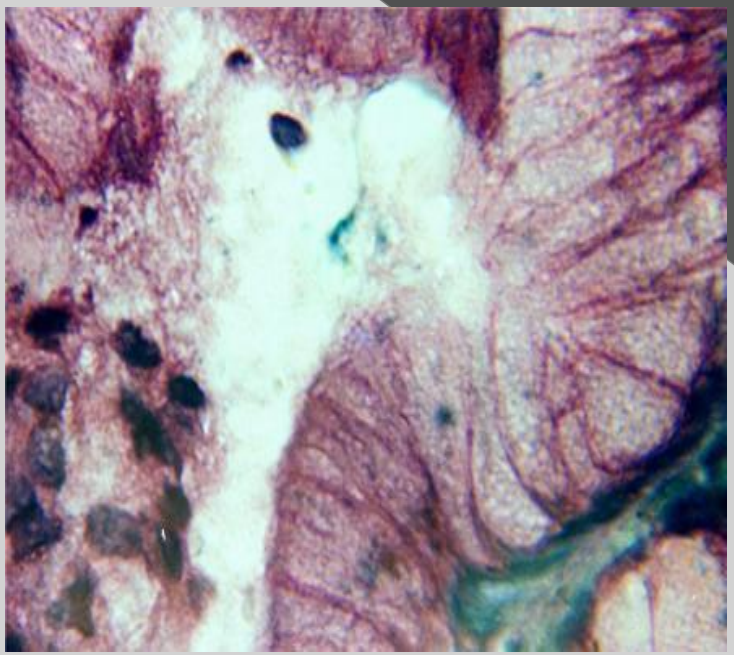
Позволяет определить степень обсемененности и расположение микробных тел (поверхностное, внутриклеточное), форму микроорганизма (вегетативную или кокковую), характер морфологических тканей.

Иммуногистологический метод, проводимый с применением меченых моноклональных антител облегчает обнаружение Н.р. в срезах и проявляет более высокую специфичность (97%) при чувствительности в 80-90%.

Недостатки:

1. Материал для исследования получают инвазивным путем.
2. Не всегда удается правильно определить место взятия биоптата (при низком уровне секреции HCl *H.pylori* может колонизировать любой отдел желудка, при повышенной кислотности единственным местом, где может паразитировать микроорганизм, является антральный отдел желудка и участки желудочной метаплазии в 12-перстной кишке).
3. Обычным гистологическим методом нельзя отличить H.pylori от других хеликобактерий .

ЦИТОЛОГИЧЕСКИЙ МЕТОД



Состоит в окраске бактерии в мазках-отпечатках или раздавленных биоптатах, а также мазках пристеночной слизи желудка.

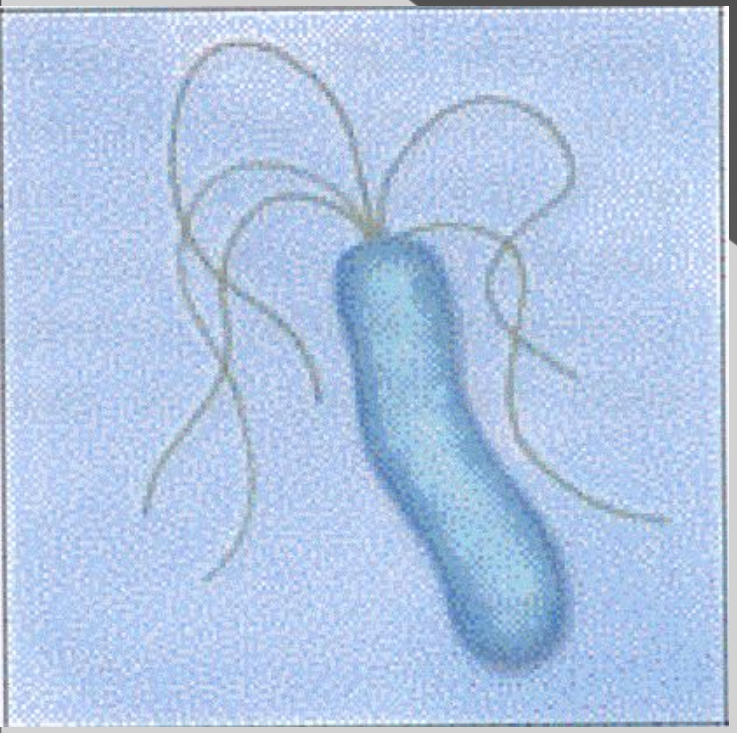
Применяется только в России.

Недостатки:

Метод низко чувствителен (не более 20%).

Не пригоден для контроля эффективности лечения.

ИЗОЛЯЦИЯ ВОЗБУДИТЕЛЯ



Материалом для исследования служат биоптаты и желудочный сок.

Культуральный метод не нашел широкого применения в практике из-за ряда недостатков.

Включение в питательные среды β-циклодекстрина вместо фетальной сыворотки позволяет культивировать не только типичную, но и кокковую форму Н.р.

Недостатки: отсроченное получение результатов (7-14 дн.), быстрая гибель Н.р. при контакте с воздухом и при транспортировке, возможность культивирования только в микроаэрофильных условиях, частое получение отрицательного результата при низкой обсемененности проб, непригодность для изоляции кокковой формы Н. р.

Высокая стоимость.

ПЦР БИОПТАТОВ

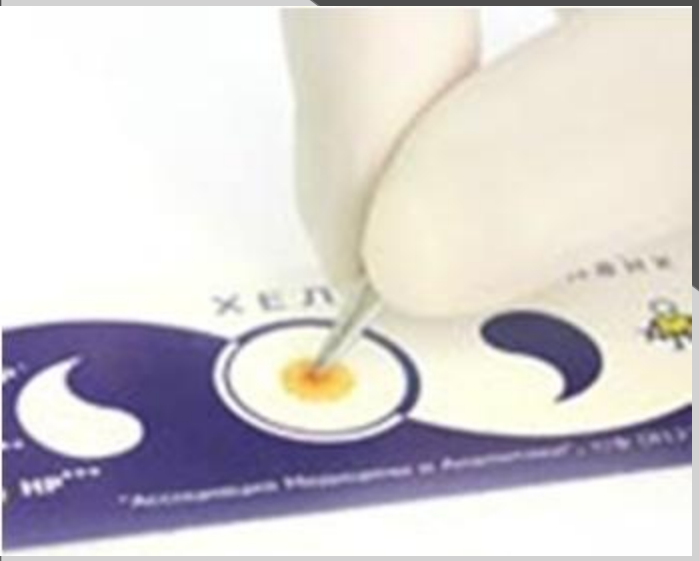
Преимущества:

Высокая чувствительность (позволяет диагностировать не только обострения инфекции, но и ее хроническую и латентную формы, возможно выявления даже единичных бактерий), как спиралевидных, так и кокковых форм H.p., идентификация генов факторов патогенности, быстрое получение результатов.

Недостатки:

Трудно подобрать универсальные маркеры для разнообразных антигенных вариантов H.p., возможность проведения только в специализированных лабораториях, высокая стоимость.

УРЕАЗНЫЕ ТЕСТЫ



Быстрый уреазный тест (CLO, HpCUT, Campy, Хеликотест-экспресс и др.)

Инвазивный тест, основан на оценке местной уреазной активности биоптата. Большинство из них позволяют получить результат в течение 1-24 ч (в зависимости о тяжести инфекции). Новый RUT-тест (Vaira et al, 2010) дает результат в течение 5-60 мин с 90-96% чувствительностью и почти 100%-й специфичностью.

.

Недостатки

Не позволяет выявлять инфекцию кокковой формы H.b. из-за отсутствия у нее уреазной активности.

Не применим для исследования проб, взятых не в желудке, а в других отделах пищеварительного тракта, т.к. уреазу образуют и другие бактерии - Proteus mirabilis, Proteus vulgaris, Morganella Morganii, Providencia rettgeri, Providencia stuartii, Klebsiella pneumoniae, Klebsiella oxitoca.

НЕДОСТАТКИ «ИНВАЗИВНЫХ» МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ

Проведение эндоскопии и взятие биотатов сопряжено с:

- перенесением пациентом **стресса.**
- **травмированием** слизистой оболочки желудка/12-перстной кишки
- **значительной затратой времени** специалистов (на взятие проб, их подготовку и исследование
- необходимость в **специальной аппаратуре**
- Их, как правило, могут проводить только **высококвалифицированные** специалисты).

По данным , Службы здравоохранения Великобритании затраты на диагностику ХБ при традиционной тактике обследования и лечение одного пациента составляют в среднем 405 фунтов стерлингов, в то время как «неинвазивная» обходится **в 2 раза дешевле**.

НЕИНВАЗИВНЫЕ МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

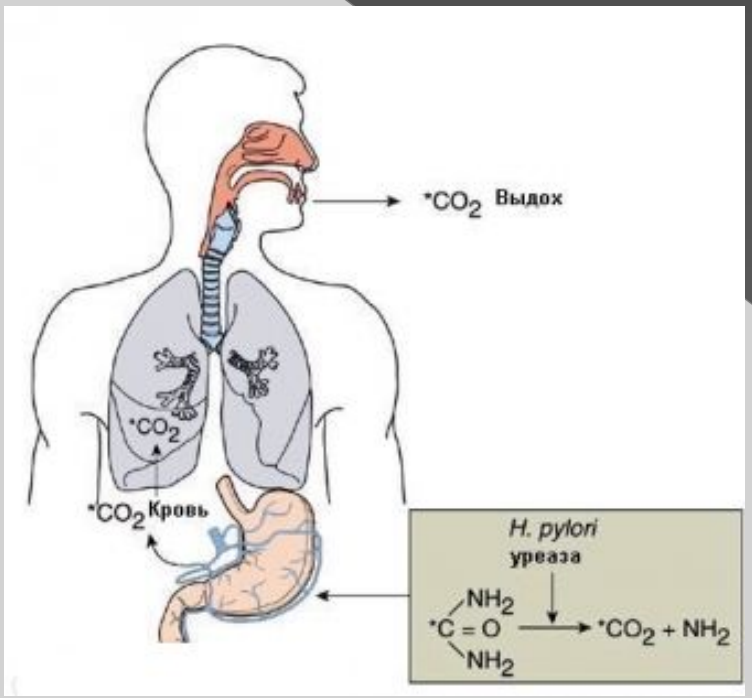
* Дыхательный тест

* * Серологические тесты

* * * Обнаружение генома Н.Р в кале

* * * * Обнаружение антигена Н.р. в кале

УРЕАЗНЫЙ ДЫХАТЕЛЬНЫЙ ТЕСТ



Определение содержания аммиака или углекислого газа в выдыхаемом воздухе после приема пациентом порции мочевины, меченой изотопами углерода.

Преимущества: неинвазивный, количественный, достаточно быстро дает результат, обладает (за исключением колориметрического аэротеста) высокими чувствительностью (90%) и специфичностью (90%).

Недостатки:

-высокая стоимость (изотопы, оборудование)

- не выявляет уреазонегативные штаммы Н.р.

- может проявлять низкие специфичность и чувствительность после приема висмутсодержащих и антисекреторных препаратов и при использовании ^{13}C в низкой дозе.

Показания для применения:

- эпидемиологические исследования
- скрининг перед эндоскопией
- наблюдение больных после лечения.

СЕРОЛОГИЧЕСКИЕ МЕТОДЫ

Инфекция H.b. сопровождается синтезом специфических антител, для выявления которых применяют **ИФА, РСК, РА, РПГА, западный блотинг, ИХТ.**

Позволяют выявлять в крови и моче IgG и IgA , в слюне и желудочном соке -секреторные IgA.

Дают положительный результат через 1 мес. после заражения.

ИФА – считается лучшим методом серологической диагностики. Доступны зарубежные и отечественные наборы.

Преимущества: неинвазивный, высокочувствительный (до 94%) и специичные (до 98%), количественный, дешевле других традиционных средств диагностики.

Недостатки: не позволяют дифференцировать текущую и прежнюю инфекции, не пригодны для контроля лечения, значительная вариабельность чувствительности и специфичности.

ОБНАРУЖЕНИЕ ГЕНОМА H.PYLORI В КАЛЕ

В России НПФ «ЛИТЕХ», разработана ПЦР, сопоставимая по чувствительности и специфичности с ИФА.

Ряд зарубежных фирм (Sorin, Италия; Biocode, Бельгия; Boehringer, Германия) выпускает наборы диагностикумов для ПЦР-ИФА.

Преимущества: возможность исследования проб, взятых неинвазивными методами, высокая чувствительность

Недостатки: те же, что и у ПЦР, применяемой для исследования биоптатов.

ОБНАРУЖЕНИЕ АНТИГЕНА Н.Р. В КАЛЕ

Пионером в области разработки этих методов диагностики стала американская фирма Meridian Diagnostics. Ее ИФА стал «золотым стандартом» неинвазивных методов диагностики инфекции. Ее чувствительность и специфичность составляют 91 и 90%, соответственно. Сейчас наборы реагентов для ИФА готовят Connex и др. фирмы.

Преимущества

- высокие чувствительность и специфичность (подтверждены многочисленными апробации = A. Markristatis, 1998; D. Vaira, 1999; В.М. Говорун, 2000)

- пригодность для первичной диагностики инфекции и контроля лечения.

- **Недостатки**

- довольно высокие стоимость и трудоемкость

- необходимость в применении аппаратуры при проведении теста и учете результатов

- дача положительного результата на протяжении длительного времени после лечения (на фоне отрицательных результатов инвазивных методов диагностики).

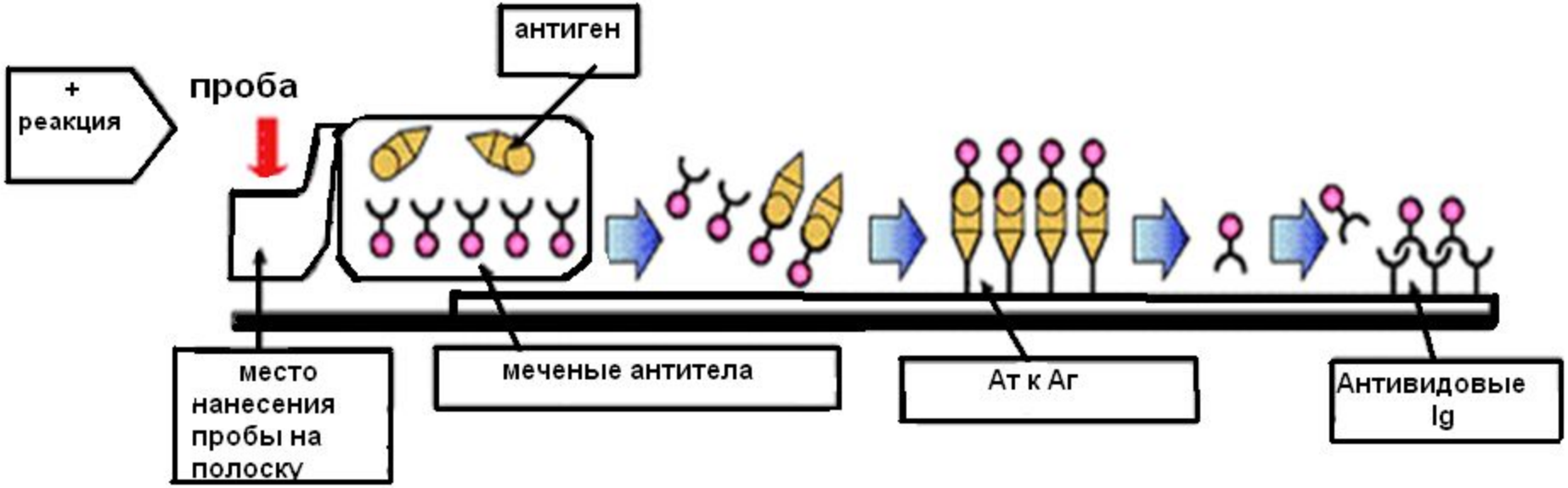
ИММУНОХРОМАТОГРАФИЯ

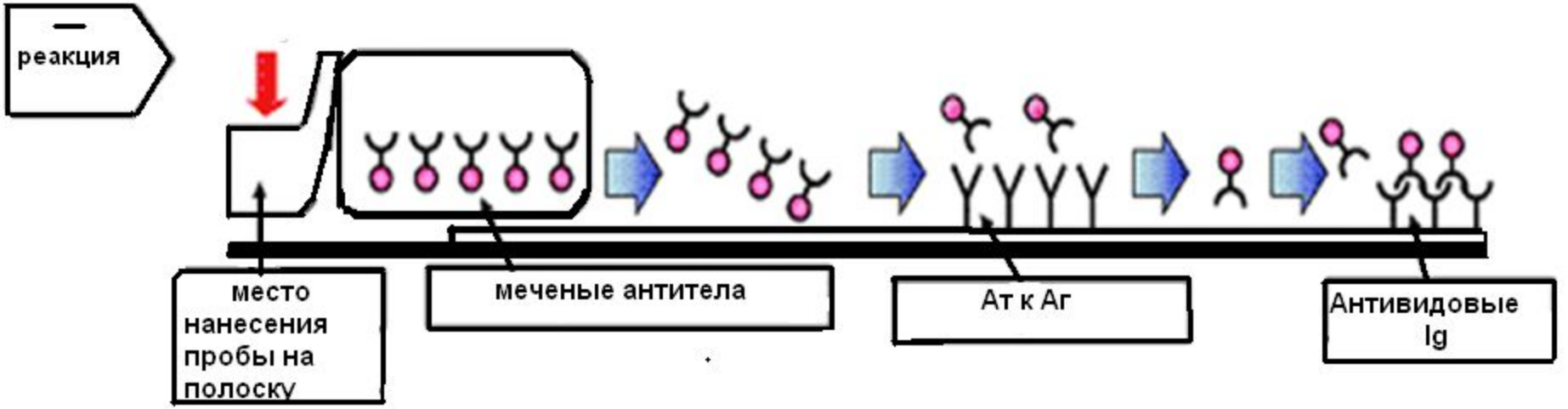
Хроматографический анализ - очень точный аналитический метод , основанный на разделении компонентов смесей. Нуждается в специальных оборудовании и реактивах, требует значительных затрат времени и труда высококвалифицированных специалистов.

Иммунологические методы основаны на взаимодействии антигенов (Аг) со специфическими антителами (Ат). Чувствительность и специфичность разных иммунологических тестов при разных инфекциях неодинаковы.

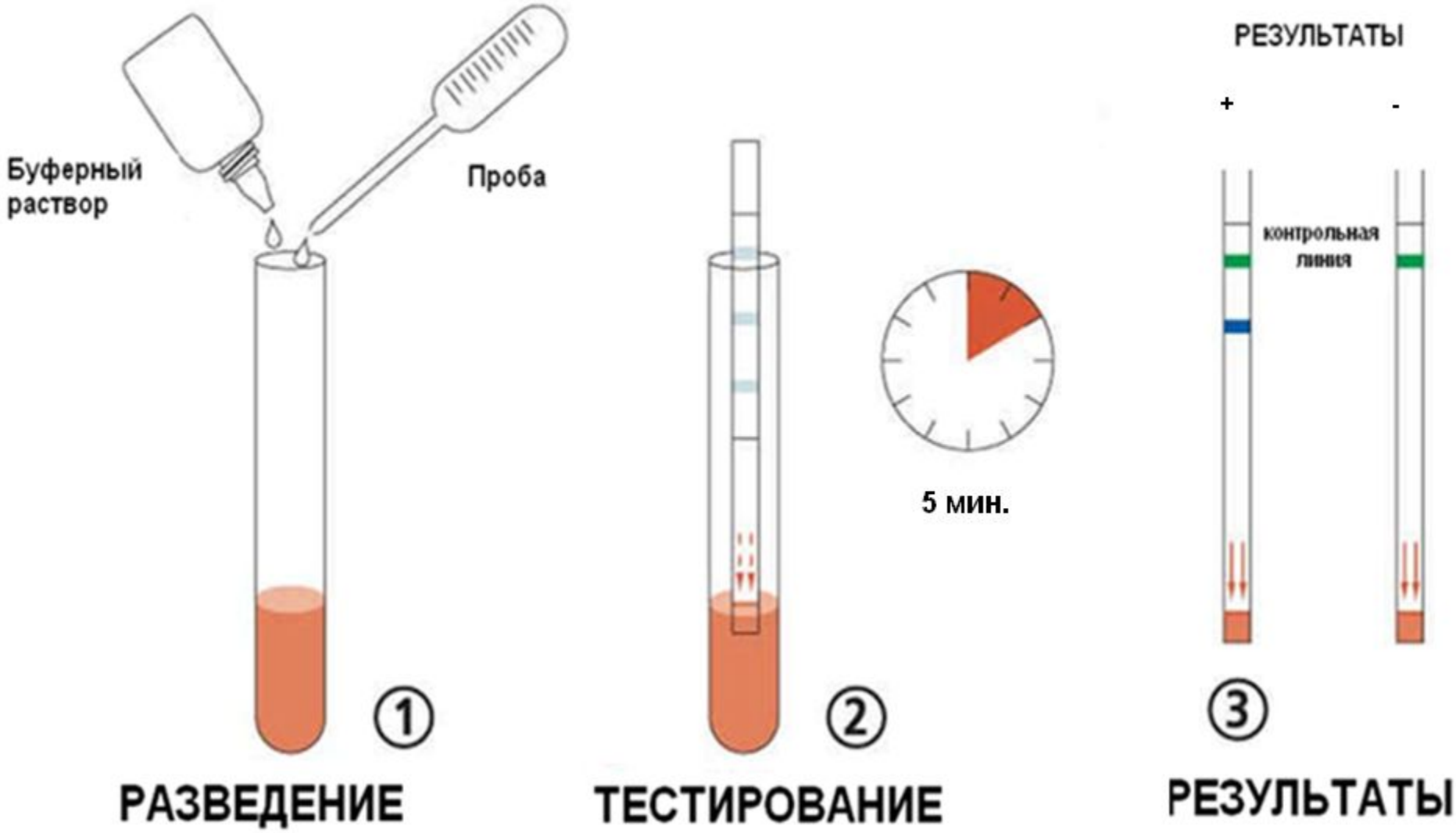
Комбинация пористо-мембранной хроматографии с иммунологическими реакциями получила название **ИММУНОХРОМАТОГРАФИИ** .

ПРИНЦИП БЕЗПРИБОРНОГО ИХТ





ЭТАПЫ БЕЗПРИБОРНОГО ИХТ



ХЕЛИКОБАКТЕР ТЕСТ (NOVAMED, ИЗРАИЛЬ)

Материал для анализа

Фекалии

Комплектация набора

20 кассет

20 пробирок с 2 мл физ/р-ра с азидом натрия (для ресуспендирования проб фекалий.

Хранение тестируемого материала

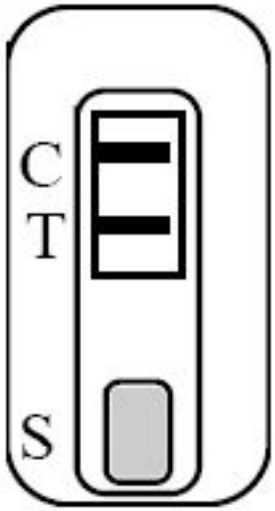
Пробы хранят до исследования в нативном виде при температуре 2-8°С не более суток. В ресуспендированном (в фирменном консервирующем растворе) виде срок хранения проб может быть увеличен до 15 дн.

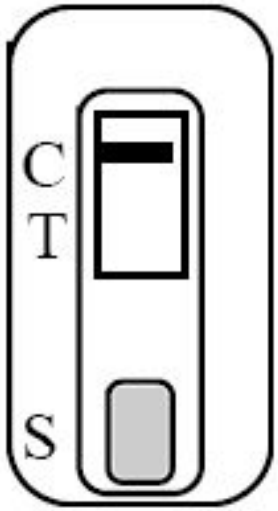
Проведение анализа

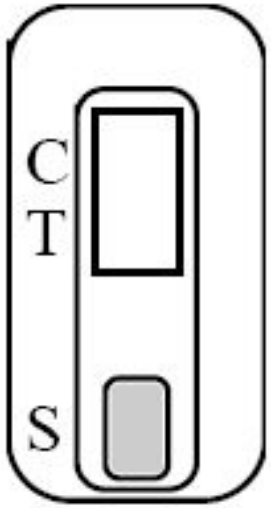
1.Вносят в окошко кассеты 3 капли суспензии пробы кала.

2.Через 5 мин. учитывают результат.

ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТА







Положительная реакция
Появление красных полос в контрольной ("С") и тестовой ("Т") зонах окна касеты.

Отрицательна реакция
Появление красной полосы только в контрольной ("С") зоне окна касеты.

Сомнительный результат
Отсутствие полосы в контрольной ("С") зоне окна касеты. Необходимо провести повторный анализ.

ДИАГНОСТИЧЕСКАЯ ЦЕННОСТЬ ИХТ

		Дыхательный тест с ^{13}C-мочевиной		ВСЕГО
		Положит. рез-т	Отрицат. рез-т	
ИХТ	Положит. рез-т	111	4	115
	Отрицат. рез-т	9	76	85
ВСЕГО		120	80	200

Чувствительность 111/(111+9) = **92,5%**
Специфичность 76/ (76+4) = **95,0%**
Точность показаний 111+76)/200 = **93,5%**

ИХТ **не дает перекрестных реакций** с E. coli, Staphylococcus aureus, Campylobacter coli, Campylobacter jejuni и Enterococcus faecalis

ПОРОГ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИХТ

Концентрация антигена H.pylori (нг/мл)	0	50	100	150
Число тестированных в ИХТ проб	60	60	60	60
Число проб, давших в ИХТ + реакцию	0	10	60	60
Число проб, давших в ИХТ - реакцию	80	50	0	0

Порог чувствительности ИХТ не ниже 100 нг антигена Н.р./ мл

ЭФФЕКТИВНОСТЬ МЕТОДОВ ДИАГНОСТИКИ

Применяемые сейчас методы лабораторной диагностики хеликобактериоза свидетельствует об их достаточно высоких чувствительности (80-95%) и специфичности (90-100%)

Метод диагностики	**Основное назначение**	**Чувстви-тельность,%**	**Специ-фичность, %**
Изоляция возбудителя из биоптатов	Определение чувствительности возбудителя к антибиотикам	80	95
Быстрый уреазный тест	Первичная диагностика ХБ	90	90
Дыхательный тест	Контроль эффективности лечения	95	96
Обнаружение сывороточных антител	Скрининговая диагностика, выявление предшествующей инф.	43-82	61-95
Обнаружение антигена (ИФА, ИХТ и др.)	Скрининговая диагностика, первичный диагноз, контроль эффективности лечения	90-92	93-98

По *Howden C.W. et al. Am J Gastroenterol, 1998, 93, 12, 2330-2338; Gisbert J.P. et al. Helicobacter, 2004, 9, 4, 347-368 и данным производителей диагностику*мов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ИХТ – специфический метод диагностики инфекции Н.р., проводимый с пробами (фекалии), получаемыми неинвазивным путем.

Позволяет быстро (в течение 5 мин) определить наличие инфекции.

Тест высокочувствителен- выявляет антиген Н.р. в фекалиях в концентрации , по меньшей мере, 100 нг/мл.

Его оказания воспроизводимы и специфичны (перекрестных реакций с другими бактериями, в т.ч. кампилобактериями не установлено).

ИХТ можно применять в любых условиях (у постели больного, в поликлиниках, клиниках, санаториях и т.п.), поскольку он не нуждается в аппаратуре и дополнительных реагентах на преаналитическом и аналитическом этапах, ав также для учета результатов.

На сегодняшний день ИХТ - самый простой и экономичный тест, обладающий высокими чувствительностью и специфичностью, что делает его пригодным для скрининга и первичной диагностики инфекции H.pylori, а также подтверждения эрадикации возбудителя (через 1 мес после лечения).

Рекомендации Европейской рабочей группы по изучению H. pylori (Маастрихт-3, 2005)

- При проведении эндоскопии → быстрый уреазный тест.
- Без эндоскопии → уреазный дыхательный тест/ выявление Н. р. в кале/серологический тест (не позволяет отличить текущую инфекцию от ранее перенесенной, низкая чувствительность у детей).
- Контроль эффективности эрадикации Н. р. → дыхательный тест или выявление антигена в кале.
- Антисекреторные препараты снижают частоту обнаружения Н. р. в кале и чувствительность дыхательного теста.

Обнаружение антигена Н.р. в кале применимо как для первичной диагностики инфекции, так и для контроля эрадикации возбудителя