

## Результаты клинических (медицинских) испытаний.

Результаты обследования с помощью газоанализатора «HelicoSense» представлены в таблице N4.

Результаты исследования	КГ-1	КГ-2	КГ-3	ОГ-4	Всего:
Положительные	12	7	0	4	23
Сомнительные	5	5	1	1	12
Отрицательные	2	10	9	13	34
Всего:	19	22	10	18	69

Таблица N4. Данные обследования газоанализатором «HelicoSense».

У 69 обследованных в 35 случаях (50,7%) была выявлена уреазная активность, в 34 случаях она не отмечалась (49,3%). В выборке КГ-1 уреазная активность отмечена у 17 лиц (89,5%), а ее отсутствие у 2-х (10,5%). В выборке КГ-2 дыхательный тест был положительным в 12 случаях (54,5%), а отрицательным в 10 случаях (45,5%). В выборке КГ-3 значимая концентрация аммиака отмечена у одного человека (10%) и у 9 (90%) она оказалась в пределах нормы. Среди лиц ОГ-4 уреазная активность выявлялась у 5 человек (27,8%), а у 13 человек (72,2%) ее отмечено не было. Полученные данные соответствуют литературным данным, представленным в исследованиях [5], проведенных в разных регионах земного шара.

Следует отметить, что уровень обсемененности *H. pylori* в выборке КГ-1 значительно выше, чем во второй и третьей контрольных группах. Это обусловлено, скорее всего, тем, что молодые люди из этой выборки постоянно контактируют друг с другом на протяжении длительного времени и часто объединены общими бытовыми условиями. В такой ситуации, создаются благоприятные условия для реализации фекально-орального и орально-орального путей передачи возбудителя. Необходимы методы, позволяющие диагностировать хеликобактериоз при диспансерном обследовании этих лиц. Во второй контрольной группе, подобранной из случайных людей, уреазная активность выявлялась значительно реже. При отборе и комплектовании КГ-3 проводился контроль за отсутствием жалоб со стороны желудочно-кишечного тракта, что, вероятно, и обусловило низкую обсемененность лиц из этой группы.

У лиц из КГ-2, КГ-3 и ОГ-4 в сыворотках крови определялись антитела к антигенам *H.p.* в двух разных тестах. В Приложении N4 представлены результаты этих параллельных исследований методом иммуноферментного анализа (ИФА) и методом иммуноблоттинга.

Одинаковые результаты в 1 и повторном опытах ИФА составили 89,6%.

Методом иммуноблоттинга оценивалось наличие IgG к антигену *Ca9A*, что соответствует полосе на стрипе, сформированной антигенной массой, 116 kD. Результаты в двух повторных опытах были одинаковыми в 87,5%. Если

два исследования были отрицательны, результат расценивали как антителоотрицательный.

В Приложении 5 и Таблице N5 представлены данные о корреляции

Выборки КГ-2, КГ-3, ОГ-4		Антитела	
		-	+
Дыхательный тест	-	17	15
	+	6	10

Таблица N5. Сравнительные данные иммунологического и биохимического методов.

результатов дыхательного теста и иммунологического исследования. Совпадение результатов отмечено в 27 случаях (56,3%): в 17 случаях титр антител и количество аммиака в выдыхаемом воздухе были диагностически не значимы, а в 10 высокими. Коэффициент корреляции составил  $\rho_{AB}=0,36$ ,  $\sigma_A=0,92$ ,  $\sigma_B=1$ . Различия А-В в терминах сигмы равно

1,72. Значения лежат в пределах интервала двух сигм. Следовательно, корреляция есть, и сила связи характеризуется как слабая. Следует отметить, что подсчет проводился по трем группам, одной из которых является группа КГ-3, состоящая из больных гипертонической болезнью и в этой группе корреляция показателей отсутствовала. По-видимому, за счет этой группы общий коэффициент корреляции был низким. При расчетах  $\chi^2=0,5$ ,  $p=0.5$ , что соответствует средней вероятности случайных совпадений.

В то же время у 15 человек (31,3%) при отсутствии уреазной активности определялись АТ к антигену СаgА. Эти люди имели контакт с *H. pylori* в анамнезе.

В настоящее время известно, что *H. pylori* при формировании неблагоприятных условий переходит из спириллоподобной формы в кокковидную (по мнению некоторых авторов, это сферобласты или протопласты [6]), значительно более устойчивую к воздействию окружающей среды [10,11]. Это способствует сохранению вида и облегчает передачу микроба в другой организм. Кокковидные формы обладают несколько иной иммуногенной активностью и продуцируют очень мало уреазы или не продуцируют ее вообще [12]. Такими неблагоприятными условиями может стать антибиотикотерапия, проведенная по поводу другого заболевания или прием других препаратов, обладающих бактериостатическими свойствами.

От других бактерий, образующих уреазу, *H. pylori* отличается еще и тем, что фермент у них располагается не только в цитоплазме, но и на поверхности клеток [6]. Это происходит в результате аутолиза части клеток и адсорбции фермента на поверхности выживших бактерий. Наличие внеклеточной уреазы имеет большое значение для приживания бактерий в МЭН. Будучи сильным антигеном, фермент связывает антитела и в итоге секреторные иммуноглобулины могут ингибировать уреазную активность *H. p.* Кроме того, может иметь значение иммунная реактивность организма человека. При высокой иммуногенности антитела будут обладать бактериостатическими свойствами. Больные с таким иммунным статусом входят в группу риска и требуют дальнейшего наблюдения.

В 6 случаях (12,5%) дыхательный тест был положителен, а антитела в сыворотке не определялись. Это можно наблюдать при первичном заражении пациентов, когда уровень иммуноглобулинов в крови еще не успел достигнуть диагностически значимых величин.

Отличительной и чрезвычайно важной характеристикой *H. pylori* является его способность изменять олигосахаридный состав О-специфических цепей своего ЛПС таким образом, что он становится идентичным строению поверхностных антигенов эукариотических клеток. Иными словами, имеет место мимикрия, обеспечивая тем самым формирование одного из механизмов иммунного уклонения.[6] И, наконец, *H.p.* отличается высоким генетическим полиморфизмом. Известно, что «островок патогенности», маркером которого является антиген CagA, обнаружен лишь у 50% штаммов [6]. Возможно заражение микробами, обладающими CagA отрицательным статусом. В таком случае серологический тест будет отрицательным т.к. определяет антитела только к факторам патогенности. Ответить на этот вопрос можно будет после повторного проведения иммуноблоттинга и выявления других факторов патогенности возбудителя.

В выборке КГ-2 выявляемость хеликобактериоза с помощью аппарата «HelicoSense» составила 50%, а иммунологическими методами 40%. (Табл. №6). Учитывая небольшое кол-во обследованных больных это довольно высокий показатель. Прибор может быть использован для первичной диагностики *H.p.* В 2-х случаях антитела выявлялись на фоне отрицательного дыхательного теста. Но об этих пациентах известно, что в течение полугода

Лица из выборки КГ-2		Антитела	
		-	+
Дыхательный тест	-	8	2
	+	4	6

Таблица №6. Сравнительные данные иммунологического и биохимического методов в выборке КГ-2.

они принимали антибактериальные препараты по поводу респираторных инфекций, что могло привести к эрадикации *H.p.* или ее переходу в кокковидную форму. О причинах отсутствия антител при положительном дыхательном тесте было сказано. Коэффициент корреляции составил  $\rho_{AB}=0,42$ ,  $\sigma_A=0,89$ ,  $\sigma_B=0,96$ . Различия А-В в терминах сигмы

равно 0,53. Значения лежат в пределах интервала двух сигм. Следовательно, корреляция есть, и сила связи характеризуется как средняя. Если исключить четыре крайних результата, то  $\rho_{AB}=0,86$ ,  $\sigma_A=0,85$ ,  $\sigma_B=0,95$ . Различия А-В в терминах сигмы равно 0,63. Значения лежат в пределах интервала двух сигм. Следовательно, корреляция есть, и сила связи характеризуется как сильная. По оценке методом  $\chi^2=1,875$ ,  $p=0,2$ . Вероятность отсутствия связи низкая.

Лица из выборки КГ-3	Антитела
----------------------	----------

		-	+
Дыхательный тест	-	4	5
	+	1	0

Таблица N7. Сравнительные данные иммунологического и биохимического методов в выборке КГ-3.

В выборке КГ-3 в 40% оба метода не выявили бактерию (Табл. N7). Следует отметить, что 5 пациентов с отрицательным дыхательным тестом были серопозитивными. Напомним, что в эту группу отобраны пациенты с отсутствием каких-либо жалоб со стороны желудочно-кишечного

тракта. M.J. Buckley et al. (1998) сообщают, что серопозитивные по Н.р. люди с отсутствием болезненных симптомов, имеющие нормальную слизистую оболочку желудка, составляют 56,8% из 1000 наблюдений. Наличие антител в крови позволяет говорить только о том, что человек контактировал с микробами ранее. Но о том, что происходит в настоящий момент в организме судить нельзя. При расчетах корреляция не обнаружена.

При рассмотрении обеих контрольных групп, обращает внимание то, что наличие антител в крови при отрицательным дыхательном тесте зафиксировано в 36,8% (у 7 лиц из 19-ти). При положительном дыхательном тесте этот показатель намного выше 54,5% (в 6 случаях из 11). А в опытной группе еще выше 80% (у 4 человек из 5).

В ОГ-4 – 8 серопозитивных пациентов с отрицательным дыхательным тестом (44,4%). (Табл. N8). Подобный результат можно объяснить высокой вероятностью приема антацидных препаратов, ингибиторов протонной помпы лицами данной группы в анамнезе. Кроме того, выраженный местный и общий иммунный ответ организма может подавлять уреазную активность Н.р. В 50% результаты серологического и дыхательного тестов совпадали. Коэффициент корреляции составил  $\rho_{AB}=0,49$ ,  $\sigma A=0,82$ ,  $\sigma B=0,99$ .

Различия А-В в терминах сигмы равно 1,81. Значения лежат в пределах

Лица из выборки ОГ-4		Антитела	
		-	+
Дыхательный тест	-	5	8
	+	1	4

Таблица N8. Сравнительные данные иммунологического и биохимического методов в выборке ОГ-4.

интервала двух сигм. Следовательно, корреляция есть, и сила связи характеризуется как средняя.

Лица из выборки ОГ-4 были обследованы более тщательно. После проведения ЭГДС биопсийный материал обрабатывали морфологическим и молекулярно-генетическим методами. Результаты ПЦР приведены на Рис. N1, в Табл. N9 и N10.

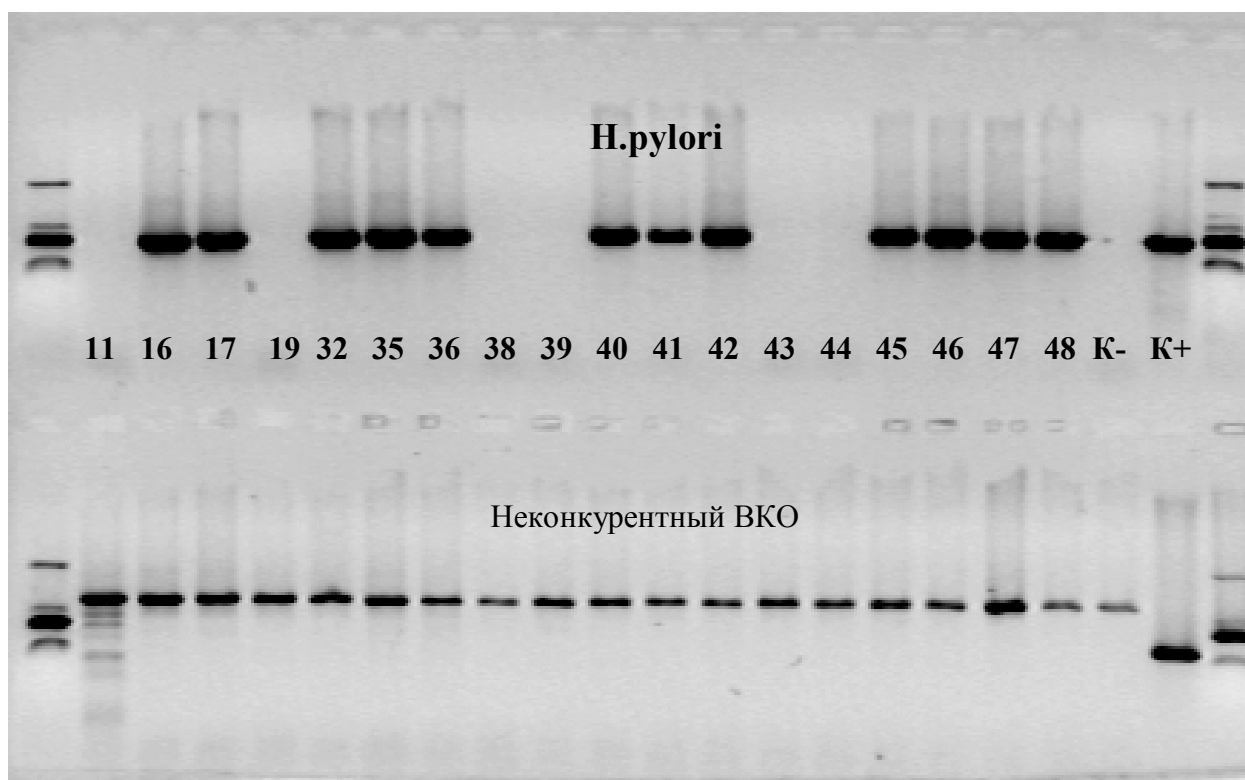


Рис N1. Идентификация фрагмента гена 16S-рибосомальной РНК *H. pylori* в агарозном геле. Обозначения: K- - негативный контроль; K+ - позитивный контроль; 11...48 – номера исследуемых образцов.

N	ФИО	Дыхательный тест	ПЦР
11	Е.В.Ф.	0	0
38	К.В.В.	0	0
39	С.Е.А.	0	0
43	Ч.Е.А.	0	0
44	З.И.	0	0
16	Н.А.Л.	0	2
32	М.О.В.	0	2
35	К.Д.В.	0	2
41	Н.С.В.	0	2
42	С.Н.Н.	0	2
45	Ф.Т.М.	0	2
47	К.А.Е.	0	2
48	А.Н.С.	0	2
19	М.Р.В.	2	0

17	А.И.В.	1	2
36	Х.Т.Р.	2	2
40	Б.В.А.	2	2
46	К.В.Л.	2	2

Таблица N9. Сопоставление результатов исследования биоптатов методом ПЦР и дыхательного теста.

Лица из выборки ОГ-4		ПЦР	
		-	+
Дыхательный тест	-	5	8
	+	1	4

Таблица N10. Сравнительные данные молекулярно-генетического и биохимического методов в выборке ОГ-4.

Результаты были одинаковыми либо «←», либо «+» у 9 человек (50%). В 8 (44,4%) случаях Наблюдалось несоответствие: уреазной активности нет, а наличие бактерий доказано ПЦР. Но молекулярно-генетический выявляет даже незначительное количество микробов и не дифференцирует бактерионосителей.

Кроме того, не исключена вероятность контаминации гастроскопов или

бактериями из ротовой полости пациента или мертвыми, оставшимися на гастроскопе после дезинфекции.

Известно, что *H. pylori*, обнаруживали бактериологическим методом в 44,4% случаев (5,25 Ig КОЕ/г) у здоровых людей с эндоскопически интактной слизистой желудка [12], а при воспалении микрофлора становится более разнообразной. Таким образом, в данной ситуации дыхательный тест становится важным для определения хеликобактериоза как клинической нозологии. При наличии уреазной активности можно утверждать, что причиной гастрита является именно *H. p.*, а при ее отсутствии необходимо продолжить диагностический поиск. Отдельного внимания требует пациент N19 М.Р.В., 22 лет. Он поступил с жалобами на боли в эпигастральной области, возникающие через 1 час после еды и на вздутие живота. Показатель уреазной активности составлял у него 1,44. При обследовании выявлен поверхностный гастрит. В теле желудка картина хронического атрофического гастрита с энтерализацией фундальных желез, минимальной лимфопролиферативной инфильтрацией стромы. Гистологический и молекулярно-генетический методы *H. p.* не выявили, но при определении антител в первом опыте антитела выявлялись в титре 1/10, а повторном <1/5. В желудке здоровых людей с эндоскопически интактной слизистой может находиться множество бактерий, обладающих уреазной активностью, в 75% *Stafilococcus spp.*, а у больных хроническим гастритом 74% микрококков, 55,5% стафилококков, 51,9% стрептококков и т. д. [12]. Но, как правило, микробы высеваются в небольшом количестве и активность фермента мала. Вероятно, в данном случае, имеет место другая этиология заболевания желудка, но также возможна незначительная обсемененность *H.p.* на фоне снижения иммунитета. Этот пациент при дальнейшем анализе результатов не учитывался.

При проведении морфологического исследования биоптаты окрашивались гематоксилин-эозином. Окончательно интерпретировать их не представляется возможным из-за большого разброса показателей. Таким образом, в проведенном исследовании морфологический тест представляется не надежным. В связи с этим планируется дополнительная селективная окраска части биоптатов азур-эозин метиленовым синим, р-ром содержащим метанол с целью уточнения результатов, однако некие предварительные результаты обобщены нами в итоговой таблице N11.

<b>№</b>	<b>ФИО</b>	<b>Дыхательный тест</b>	<b>АТ</b>	<b>ПЦР</b>	<b>Морфологическое исследование</b>
39	С.Е.А.	0	0	0	2
44	З. И.	0	0	0	2
41	Н.С.В.	0	0	2	2
45	Ф.Т.М.	0	0	2	2
48	А.Н.С.	0	0	2	2
11	Е.В.Ф.	0	2	0	0
43	Ч.Е.А.	0	2	0	0
38	К.В.В.	0	1	0	2
16	Н.А.Л.	0	2	2	0
42	С.Н.Н.	0	2	2	0
32	М.О.В.	0	2	2	2
35	К.Д.В.	0	2	2	2
47	К.А.Е.	0	2	2	2
17	А.И.В.	1	2	2	2
36	Х.Т.Р.	2	2	2	2
40	Б.В.А.	2	2	2	2
46	К.В.Л.	2	2	2	2

*Таблица N11. Сопоставление результатов морфологического исследования с другими методами у лиц из выборки ОГ-4.*

Представленные результаты свидетельствуют о том, что в 57% дыхательный тест сочетался с 3-мя положительными тестами, выявившими Н.р.: ПЦР, серологический тест, морфология. Таким образом, положительный дыхательный тест играет роль исследования, позволяющего констатировать наличие хеликобактериоза у больных в 57%. Если дополнить дыхательный тест другим неинвазивным исследованием (серолодиагностикой), то такой неинвазивный комплексный метод приобретает еще большую надежность и обеспечивает дифференцированный подход к данному заболеванию в каждом конкретном случае.

Далее представлена Таблица N12, объединяющая результаты всех методов исследований в группе пациентов с заболеваниями желудочно-кишечного тракта.

Группа (кол-во лиц из выборки ОГ-4)	N	ФИО	Дыхательный тест	АТ	ПЦР
1(2)	39	С.Е.А.	0	0	0
	44	З.И.	0	0	0
2(3)	41	Н.С.В.	0	0	2
	45	Ф.Т.М.	0	0	2
	48	А.Н.С.	0	0	2
3(3)	38	К.В.В.	0	1	0
	11	Е.В.Ф.	0	2	0
	43	Ч.Е.А.	0	2	0
4(5)	16	Н.А.Л.	0	2	2
	32	М.О.В.	0	2	2
	35	К.Д.В.	0	2	2
	42	С.Н.Н.	0	2	2
	47	К.А.Е.	0	2	2
5(4)	17	А.И.В.	1	2	2
	36	Х.Т.Р.	2	2	2
	40	Б.В.А.	2	2	2
	46	К.В.Л.	2	2	2

Таблица N12. Сопоставление результатов всех методов исследования у лиц из выборки ОГ-4 (17 человек).

В 6-х случаях (35,3%) данные совпали по всем методам. Можно утверждать, что у 5-ти человек заболевания желудка и двенадцатиперстной кишки ассоциированы с Н.р., а у 2-х не связаны с ним. Еще у трех лиц выявлялись антитела в крови, но молекулярно-генетическим методом возбудитель не обнаружен и уреазной активности также нет. Это больные, длительно страдающие заболеваниями желудочно-кишечного тракта, проводившие антибиотикотерапию в течение 1 года, что привело к эрадикации Н.р., а антитела могут циркулировать до 12 месяцев. Скорее всего, обострение заболевания в настоящее время обусловлено другими причинами. У трех обследуемых возбудитель обнаружен только молекулярно-генетическим методом (N41, N48, N45). Эти пациенты предъявляли жалобы в течение нескольких лет. Но либо обсемененность настолько мала, что АТ не достигли диагностически значимого титра, либо это кокковые формы с низкой иммуногенной и уреазной активностью. У этих людей также возможны другие причины развития гастрита и язвы желудка: у N41 Н.С.В. - алкогольная болезнь, у N48 А.Н.С. - дискинезия желчевыводящих путей, а у N45 Ф.Т.М. с язвенной болезнью желудка сопутствующим диагнозом был сахарный диабет II типа. В 5 случаях выявлена иммунная реакция на инфицирование и наличие бактерии подтверждено ПЦР. Отсутствие уреазной активности, видимо, связано с высокой напряженностью иммунитета у этих больных и ингибированием уреазной активности или об эффективности проводимой ими ранее терапии. В динамике ожидается (и будет подтверждено при повторном обследовании) снижение титра антител.



## Обсуждение результатов.

Иммунологические методы являются «зеркалом», отражающим изменения, происходящие в организме при заражении Н.р. Выявив в крови антитела к *CagA*, мы можем сделать вывод о том, что человек контактировал со штаммами микроба, содержащими этот ген. Судить об остроте процесса этот метод не позволяет т.к. для снижения титра антител необходимо около полугода. Так же ничего нельзя сказать о степени обсемененности бактериями желудка и двенадцатиперстной кишки. В то время, как наличие уреазной активности свидетельствует не только о присутствии Н.р. в организме в настоящий момент, но и выработке фермента уреазы, являющегося одним из факторов патогенности, а значит об остроте процесса. Результаты работы подтверждают этот тезис. В ОГ-4 из 5 человек с положительным дыхательным тестом у 4-х наличие микроба подтверждено тремя другими методами. В КГ-2 только у двух человек обнаружены антитела при отсутствии высокого уровня аммиака в выдыхаемом воздухе. Скорее всего, имеет место заражение штаммами, не содержащими «островок патогенности». Конечно, в этой связи, необходимо подтвердить наличие уреазы методом иммуноблоттинга, что будет сделано в дальнейшем. Но, возможно, имеет место манифестная форма хеликобактериоза, когда уровень антител еще не успел достичь диагностически значимых величин. Тем не менее, выявляемость хеликобактериоза в КГ-2 методом ИФА и с помощью аппарата «HelicoSense» сопоставимы (50% и 40% соответственно). Учитывая все сказанное, не остается сомнений в том, что определение аммиака в выдыхаемом воздухе является методом выбора при проведении диспансерных осмотров населения с выявления группы риска. Особенно это важно для лиц молодого возраста, например, студентов. Этим прибором необходимо оснастить районные и студенческие поликлиники. Нами предложена схема обследования таких лиц (Приложение 6).

Как уже говорилось, значительной проблемой является контроль эффективности эрадикационной терапии. Гистологические и молекулярно-генетические методы часто диагностически не точны. Иммунологические методы не могут быть использованы из-за временных рамок. Дыхательный уреазный тест является очень дорогим методом обследования. В настоящее время, «HelicoSense» - единственным прибор, позволяющий выполнять эту задачу. Он прост и удобен в применении, комфортен для пациента, отмечается безопасность и безвредность. Большое значение имеет низкая стоимость и скорость обработки результатов. К сожалению, у лиц длительно страдающих заболеваниями желудка и двенадцатиперстной кишки взаимодействие микро- и макроорганизма не всегда позволяет диагностировать Н. р. этим методом. Но у больных с положительным дыхательным тестом работа врача значительно упрощается. В Приложении 7 представлена схема обследования таких больных.

## **Выводы:**

1. Дыхательный тест с помощью газоанализаторов выдыхаемого воздуха «HelicoSense» моделей «Routine» и «Scientific», по результатам проведенных исследований, может быть рекомендован в качестве скринингового метода для эпидемиологического, диспансерного обследования больших групп населения с целью выявления инфицированности Н.р.
2. Дыхательный тест целесообразно включить в состав комплексной этиологической диагностики гастрита и язвенной болезни при обследовании пациентов с заболеваниями желудка и двенадцатиперстной кишки. Для практических целей наиболее рациональным представляется использование программы, включающей гастроскопию, дыхательный тест и серологический тест (ИФА, иммуноблоттинг).
3. Дыхательный тест может применяться для контроля эрадикации Н.р. у лиц с положительным дыхательным тестом при первичном обследовании.
4. Значимым достоинством данного метода является простота в использовании, безопасность, комфортность для пациента и быстрота получения и обработки результатов.