

На правах рукописи

Вахрамеева Мария Сергеевна

**АНАЛИЗ АНТИГЕННОЙ СТРУКТУРЫ HELICOBACTER PYLORI
И РАЗРАБОТКА ТЕСТ-СИСТЕМ ДЛЯ НЕИНВАЗИВНОЙ
ДИАГНОСТИКИ ХЕЛИКОБАКТЕРИОЗА**

03.00.07 - микробиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата медицинских наук

МОСКВА-2004

Работа выполнена в Государственном Учреждении Научно-исследовательском институте эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи РАМН.

Научный руководитель: доктор медицинских наук,
профессор **Ю. А. Белая**

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
И. С. Мещерякова

доктор медицинских наук,
профессор **В. А. Малов**

Ведущая организация: Московский научно-исследовательский институт
эпидемиологии и микробиологии
им. Г. Н. Габричевского МЗ РФ

Защита диссертации состоится «**9**» апреля 2004 г. в 11 часов на заседании диссертационного совета Д 001.007.01 в Государственном Учреждении Научно-исследовательском институте эпидемиологии и микробиологии имени Н. Ф. Гамалеи РАМН по адресу: 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ГУ НИИЭМ имени Н. Ф. Гамалеи РАМН.

Автореферат разослан «**5**» марта 2004 г.

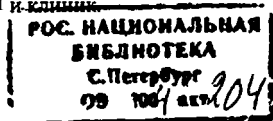
Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук, профессор

Е. В. Русакова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Открытый два десятилетия назад новый возбудитель инфекционных болезней - *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) (В. J. Marshall, J. R. Warren, 1983 г.) является одним из самых распространенных возбудителей инфекционных заболеваний среди населения планеты, в том числе и в нашей стране. Установлена его этиологическая роль в патогенезе хронического гастрита и дуоденита, язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, атрофического гастрита, МАЛТ-лимфомы и рака желудка. Накопленные за короткий срок данные по патогенезу, иммунитету и терапии инфекции, вызванной *H. pylori*, стали возможны благодаря разработанным в последние годы высокотехнологичным методам диагностики этой инфекции (Аруин Л. И., 1999, 2004 г.г.; Григорьев П. Я., Яковенко Э. Г., 1998 г.; Ивашкин В. Т., Метро Ф., Лапина Т. Л., 1999 г.; Исаков В. А., 2003 г.; Кишкун А. А. с соавт., 2001 г.; Bell D. E. et al., 1987 г.; Figura N., 1996 г.; Graham D. et al., 1987 г.).

В настоящее время существует большой набор диагностических методов (бактериологический, гистологический, «урезный» тест, полимеразная цепная реакция (ПЦР), позволяющих с достаточно высокой степенью чувствительности и специфичности выявлять наличие *H. pylori* в биоптатах желудка при заболеваниях верхних отделов желудочно-кишечного тракта. Однако, эти методы сложны в постановке, требуют специального оборудования, длительного времени для получения ответа. Более того, для взятия материала необходимо предварительное проведение эзофагогастродуоденоскопии с последующей биопсией, и потому они не могут быть использованы многократно у одного и того же больного. Широкое распространение получили серологические методы (иммуноферментный анализ, иммуноблотинг), в том числе, неинвазивные, быстро выполнимые, основанные на латекс-агглютинации или твердофазном ИФА. Определение наличия антител к *H. pylori* мало информативно, в особенности у детей до 10 лет, так как не позволяет дифференцировать факт инфицирования в прошлом от наличия *H. pylori* в настоящий момент и не подходит для оценки эффективности эрадикационной терапии, поскольку достоверное снижение титра антител происходит только спустя несколько месяцев после окончания терапии. ПЦР может быть использована и для неинвазивной диагностики, материалом при этом являются не только биоптаты, но и зубной налет, смывы ротовой полости, копрофильтрат. Применение ПЦР для исследования биологического материала часто затруднено наличием в нем ингибиторов реакции, кроме того этот метод не доступен большинству практических медицинских учреждений



Одной из важных задач здравоохранения в перспективе является интенсификация научных исследований и разработка новых ускоренных методов идентификации возбудителей инфекционных заболеваний (Онищенко Г. Г., 2003 г.).

С 1983 г. по рекомендации экспертов ВОЗ в перечень экспресс-систем включена реакция коагулирования (РКА) при условии применения стандартных образцов диагностических препаратов.

К настоящему времени разработаны, апробированы и находятся на разных этапах внедрения в практику наборы тест-систем для РКА по выявлению в биологическом материале (копрофильтрат, слюна, сыворотка крови) больных кишечными инфекциями О-антигенов *Shigella flexneri* 2a, 6; *S. sonnei*; *Salmonella* серогрупп В, С1, С3, Д, Е; *Yersinia pseudotuberculosis* I и III сероваров, *Yersinia enterocolitica* 0:3; 0:9; 0:7,8; 0:6,30 и 0:4,33; *Campylobacter*; *Escherichia coli* 0:157 и др. (Белая Ю. А. с соавт., 1981, 1990, 2001, 2003 гг.).

Неинвазивные методы определения антигенов *H. pylori* в биологическом материале с помощью РКА до начала наших исследований отсутствовали. Между тем, многие вопросы хеликобактериоза, как и во всякой новой проблеме, остаются пока недостаточно исследованными. К ним относятся вопросы, связанные с изучением антигенной структуры возбудителя, выяснение закономерностей циркуляции их в организме и создание тест-систем для быстрой неинвазивной диагностики и оценки эффективности антибактериальной терапии.

Актуальность выбранной темы и своевременность ее разработки позволяет сформулировать цель и задачи нашей работы.

Цель работы. Изучение антигенного состава *H. pylori*, закономерностей циркуляции патогенетически значимых антигенов в организме человека и разработка тест-систем для неинвазивной антигендиагностики хеликобактерной инфекции.

Задачи работы.

1. Изучить антигенный состав *H. pylori*, в том числе методом иммуноэлектрофореза в агаровом геле.
2. Выделить О-антигены и высокомолекулярные белки *H. pylori*, являющиеся специфическими патогенетически значимыми маркерами этих бактерий, и получить антисыворотки к ним.
3. Изучить закономерности циркуляции антигенов *H. pylori* в организме при инфекциях, ассоциированных с этим возбудителем.

4. Разработать и испытать тест-системы для выявления специфических О-антигена и высокомолекулярных белков *H. pylori* в различных модификациях реакции коагулирования при заболеваниях желудочно-кишечного тракта.
5. Изучить частоту встречаемости антигенов *H. pylori* и других возбудителей кишечных инфекций при заболеваниях желудочно-кишечного тракта.

Научная новизна.

- Получены новые данные об антигенной структуре *H. pylori*. При исследованиях методом иммуноэлектрофореза в агаре установлено, что *H. pylori* имеет сложный состав белковых и полисахаридных антигенов. Среди них обнаружены и охарактеризованы: термостабильный О-антиген с компонентами анодной и катодной подвижности и специфический относительно термолabileный кислый полисахаридный антиген, который по своим свойствам может быть отнесен к группе К-антигенов. Установлено, что иммунофореграммы *H. pylori* и *Campylobacter* относятся к одному иммунофоретипу, однако, полисахаридные О- и К-антигены этих возбудителей четко отличаются по своей специфичности.

- Показано, что О-антиген *H. pylori* у больных с диагнозом «острая кишечная инфекция» обнаруживался в среднем у 33,2%, антигены сальмонелл выявлялись в 28,8% случаев, антигены иерсиний у 15,1% больных, шигелл и кампилобактеров - соответственно в 5,8 и 5,1% случаев.

- Специфический О-антиген *H. pylori* у больных с верифицированным этиологическим диагнозом определялся с высокой частотой (65-83%), у больных с диагнозом острая кишечная инфекция неясной этиологии (ОКИНЭ) - в 29% случаев. Установлена высокая частота одновременного выявления антигенов *H. pylori* и О-антигенов других возбудителей кишечных инфекций (55-76%), при этом *H. pylori* обнаруживался в ассоциации с двумя антигенами (30%), чаще с маркерами сальмонелл и иерсиний, или тремя (13,1%) антигенами.

- Впервые в ходе проспективных многолетних исследований на добровольцах (7 человек) прослежена частота встречаемости антигенов *H. pylori*, показано, что наличие и количество выделяемого со слюной и калом антигена находится в сильной степени корреляции с выраженностью инфекционного процесса.

- Впервые определена динамика наличия высокомолекулярных белков, являющихся маркерами цитотоксинпродуцирующих штаммов *H. pylori*, непосредственно в кале и слюне больных хроническим гастритом и язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки. Установлено, что в период обострения заболевания

наблюдается увеличение титров этих белков *H. pylori*, в период реконвалесценции при успешной терапии уровень их снижается, в период ремиссии они не выявляются.

Практическая значимость работы.

- Дополнительно к разработанным ранее в лаборатории диагностикумам 16-ти наименований (Ю. А. Белая с соавт.) для определения маркеров возбудителей основных кишечных инфекций впервые разработана специфическая и чувствительная тест-система для определения О-антигена *H. pylori* в биологических жидкостях организма (слюна, копрофильтрат, кровь) с помощью реакции коагутинации на стекле. На основе результатов работы подготовлено «Наставление по применению реакции коагутинации для неинвазивной экспресс-диагностики хеликобактерной инфекции» (ГУ НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН, 2003 г.).

- Сконструированы диагностикумы для выявления О-антигенов-маркеров возбудителей кишечных инфекций 15 нозологических групп, в том числе *H. pylori*, в высокочувствительном варианте - реакции коагутинации на планшетах. Показана принципиальная возможность и целесообразность использования этого метода для мультианализа с целью этиологической и дифференциальной диагностики кишечных инфекций в течение 24 часов полуколичественным способом выявления антигенов возбудителей в биологических жидкостях больных.

- Разработан диагностикум для реакции коагутинации на планшете с целью выявления в биологическом материале больных комплекса высокомолекулярных белков (ВМБ) с молекулярной массой 90 кДа и выше. Реакция коагутинации с ВМБ-диагностикумом позволяет выявлять белковые антигены-маркеры цитотоксинпродуцирующих штаммов *H. pylori* в кале и слюне больных при размножении возбудителя и, таким образом, верифицировать не только инфицированность *H. pylori*, но и способность штамма продуцировать токсины. Этот метод позволяет в более ранние сроки оценивать эффективность эрадикационной терапии.

Способ получения диагностикума для выявления антигенов *H. pylori* в реакции коагутинации на стекле защищен патентом № 2186394 от 31 января 2001 г. Дальнейшие расширенные клинические испытания диагностикумов для выявления О-антигенов и высокомолекулярных белков, являющихся маркерами цитотоксинпродуцирующих штаммов *H. pylori*, непосредственно в биологическом материале от больных в РКА позволят определить возможности использования их для скрининга лиц и определения инфицирования *H. pylori*, а также для оценки эффективности антибактериальной терапии.

Апробация работы. Работа апробирована на совместной научной конференции группы иммунологии энтеральных инфекций и лаборатории естественного иммунитета ГУ НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН 6 февраля 2003 г.

Публикации. По материалам диссертации опубликовано 10 работ.

Объем и структура диссертации. Диссертация изложена на 107 страницах, содержит 15 таблиц, 17 рисунков и состоит из введения, обзора литературы (3 главы), собственных исследований (4 главы), заключения, выводов, списка цитируемой литературы, содержащего 171 источник, включая 74 иностранных.

СОДЕРЖАНИЕ ДИССЕРТАЦИИ.

За период с 1999 по 2002 г. был обследован 1491 больной острыми кишечными инфекциями, среди которых было 50,5% мужчин и 49,5% женщин, дети до 14 лет составляли 28%. В возрастной структуре заболевших преобладали лица от 26 до 50 лет (47,3%).

Материалы и методы. Исследование антигенной структуры *Helicobacter pylori*, получение антигенов этого микроорганизма, антисывороток к ним и хеликобактерных тест-систем проводили с использованием типовых штаммов *Helicobacter pylori*: ATCC №700392, штамм. №26625, NCTC №11637, NCTC №11639. Для определения специфичности разработанных хеликобактерных тест-систем использовали также штаммы и выделенные из них липополисахариды (ЛПС) других возбудителей кишечных инфекций: *Campylobacter lari*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter jejuni* наиболее часто встречающихся сероваров; *Klebsiella* *Shigella flexneri* 2a, б (newcastle), *Shigella sonnei*; *Salmonella* основных В, С₁, С₂, D, Е серогрупп; *Yersinia pseudotuberculosis* и *Yersinia enterocolitica* (табл. 1). Культуру бактерий *H. pylori* выращивали на Columbia agar с добавлением 5% лошадиной крови или 5% крови доноров в микроаэрофильных условиях (5% кислорода, 15% углекислого газа, 80% азота) с использованием GAS PACK при 37° С в течение 3-5 суток.

Получение полного комплекса растворимых антигенов *H. pylori* проводили путем многократного замораживания и оттаивания по Грассе. Аналогичным образом выделяли антигены из других бактерий возбудителей кишечных инфекций.

Выделение О-антигена (липополисахарида) проводили методом экстракции горячим фенолом по Westphal O., Yahn J. [1965].

Получение высокомолекулярных белков (ВМБ) *H. pylori* осуществляли по оригинальной методике. Развивающиеся куриные эмбрионы 9-ти дневного возраста заражали в желточный мешок 3-х суточной культурой *H. pylori* штамм NCTC №11637

(vac⁺ sag⁴) в дозе 6 млрд. мкр. кл./мл по оптическому стандарту и продолжали инкубировать при 37° С в течение 2-х суток. Гомогенат погибших эмбрионов вместе с белком и желтком (эмбриональный гомогенат - ЭГ) содержал полный набор антигенов размножившегося микроорганизма, в том числе высокомолекулярных белков *H. pylori*.

Антисыворотки против O-антигенов и ВМБ *H. pylori* получали путем 5-ти кратной иммунизации кроликов гретой (100° С, 30 мин.) культурой *H. pylori* или высокомолекулярными белками *H. pylori* соответственно. Иммуноэлектрофоретический анализ (ИЭФ) проводили по методике Грабаря и Вильямса [1953] в модификации Л. А. Зильбера и Г.А. Абелева [1962]. Иммуноблот проводили согласно Towbin et al. [1979] на аппарате фирмы BioRad (Austria) совместно с д. м. н. Ю. Ф. Белым.

Реакцию коаггутинации на стекле для выявления O-антигенов маркеров кишечных инфекций проводили согласно описанию проведения и учета РКА, изложенному в методических рекомендациях «Реакция коаггутинации при кишечных инфекционных заболеваниях», утвержденных МЗ СССР 28.11.1990 г. и методических указаниях «Постановка реакции коаггутинации для экспресс-диагностики сальмонеллезов животных, обнаружения сальмонелл в кормах, продуктах питания и объектах внешней среды», утвержденных Департаментом Ветеринарии МСХ России 15.02.1995 г. Материалом для исследования служили копрофильтрат (фекалии, разведенные 1:5 фосфатно-солевым буфером (ФСБ) и неразведенная слюна, которые прогревали при 100° С в течение 20 минут и осветляли центрифугированием при 2000 об./мин. в течение 15 мин. На предметное стекло, расчерченное на сектора, наносили по 1-й капле исследуемого материала и по капле диагностикума, после осторожного перемешивания оставляли на 30-60 мин. при 37° С во влажной камере. В качестве контроля служили: исследуемый материал + ФСБ, исследуемый материал + 1% взвесь клеток *Staphylococcus aureus* Cowan I (отрицательные контроли); ЛПС в разведении 10¹² мг/мл + гомологичный диагностикум (положительный контроль). Результаты РКА оценивали по четырехкrestной шкале. Положительной считали реакцию агглютинации суспензии стафилококков с оценкой на 2+ и выше.

Определение высокомолекулярных белков *H. pylori* в РКА на планшетах. В 2-х рядах иммунологических 96-луночных планшетов с U-образным дном титровали последовательно четырехкратно до разведения 1:4096 исследуемый нативный (негретый) материал (неразведенная слюна, копрофильтрат (1:5) или сыворотка крови (1:50). Затем в верхний ряд лунок вносили диагностикум, в нижний ряд - взвесь несенсибилизированного стафилококка. Учет реакции осуществляли через 18 часов по

сопоставлению максимального титра положительной реакции на 4+ («зонтик» на дне лунки) в верхнем ряду лунок с максимальным титром положительной реакции во втором ряду. Разница в титрах первого и второго ряда лунок в 4 и более раз считалась положительной реакцией.

Статистическая обработка данных выполнена по программе «Excel-2000» и «Primer Biostatistics Version 4.03» с вычислением % выявления показателей в анализируемых группах, средней арифметической и достоверности различий непараметрических показателей по χ^2 [В. И. Сергиенко, И. Б. Бондарева, 2001].

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ.

Разработка методов диагностики инфекционных заболеваний, в том числе ассоциированных с *Helicobacter pylori*, путем определения специфических антигенов возбудителя, предполагает в первую очередь исследование антигенной структуры возбудителей, определение и выделение антигенов, которые можно использовать в качестве специфических маркеров возбудителей, получение антисывороток к ним и, наконец, разработка на их основе тест-систем, определение их качества (специфичности и чувствительности) в модельных опытах. Заключительным этапом является апробация методов на клиническом материале.

Иммунофоретический анализ антигенного состава *H. pylori*. В результате иммунофоретического исследования в агаре антигенного состава установлено, что *H. pylori* имеет несколько (не менее 8) поверхностных и глубинных растворимых антигенов (рис. 1), среди которых определяются специфические полисахаридные антигены, образующие 3 линии преципитации: 1) специфический О-антиген с высокой молекулярной массой и отрицательным зарядом, медленно движущийся в электрическом поле в анодной зоне иммунофореграммы; 2) катодный компонент О-антигена, очевидно относящийся к R-антигену; 3) специфический антиген в анодной зоне иммунофореграммы, имеющий большую, чем О-антиген в этой зоне электрофоретическую и диффузионную подвижность, свидетельствующую о его относительно меньшей молекулярной массе и кислой природе, который может быть отнесен к полисахаридным К-антигенам. Остальные антигены *H. pylori* имеют белковую природу, разрушаются при 100° С в течение 30 минут и в большинстве своем не являются специфическими для *H. pylori*.

При микроскопическом исследовании нами было установлено, что популяция штаммов *H. pylori*, состоящая преимущественно из палочковидных форм, имеет полноценную антигенную структуру K^+O^+ , популяция же штаммов, представленных в основном кокковыми формами, содержит меньшее количество К- и О-антигенов и

находится в R-форме. Различное содержание К- и О-антигенов в разных штаммах *H. pylori*, а также К- и О-антител в сыворотках крови кроликов, зависящее, очевидно, от индивидуальных особенностей животных, необходимо учитывать при разработке диагностических препаратов.

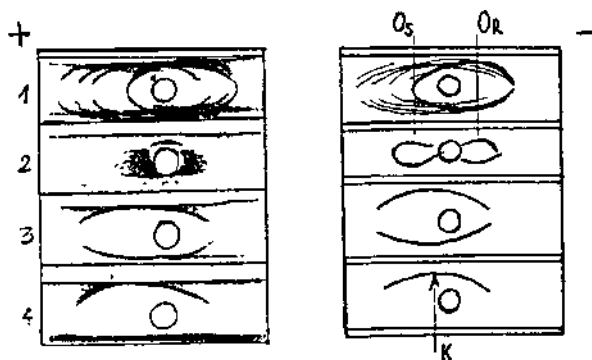


Рис 1. Иммуноэлектрофорграммы антигенов *H. pylori*.

В центральных лунках: лизаты бактерий штаммов № 26695 (1), № 11637 (3), № 11639 (4); ЛПС штамма № 26695 (2); проявлены сывороткой против культуры штамма №11637.

Проведен сравнительный анализ иммунофоретипов *H. pylori* и антигенного состава других возбудителей кишечных инфекций (шигелл, сальмонелл, иерсиний, эшерихий, кампилобактеров, цитробактеров). Установлено, что иммунофоретипы *H. pylori* и *Campylobacter* относятся к одному иммунофоретипу, однако их полисахаридные О- и К-антигены четко отличаются по своей специфичности (рис. 2).

I		<i>S. flexneri</i> 2-5 <i>Salmonella</i> <i>Citrobacter</i> <i>Y. enterocolitica</i>
II		<i>E. coli</i> O119:K69 (B) <i>S. dysenteriae</i> 1
III		<i>S. sonnei</i> S
IV		<i>S. flexneri</i> 6 (Newcastle) <i>S. boydii</i> 1-15 <i>E. coli</i> O8:K87 (B) <i>Campylobacter jejuni, coli, lari</i> <i>Helicobacter pylori</i>
V		<i>Salmonella typhi</i> <i>E. coli</i> O101:K30

Рис 2. Иммунофоретипы специфических антигенов возбудителей кишечных инфекций. По данным Белой Ю. А., 1970 г.; Петрухина В. Г., 1975 г.; Нгуен Зуй Хо, 1977 г.; Степановой Л. К., 1980 г.

Дальнейшие исследования позволят получить данные об иммунохимической природе К-антигена *H. pylori* и его роли в патогенезе и иммунном ответе при заболеваниях, ассоциированных с этим микроорганизмом.

Получение диагностикумов для определения О-антигена *H. pylori* в реакции коаггутинации на стекле. На основе кроличьих антисывороток к грымтам культурам *H. pylori* ATCC 700392 и его ЛПС, а также *H. pylori* NCTC 11637 были приготовлены диагностикумы для РСА на стекле. Особое внимание было уделено определению специфичности хеликобактерных сывороток и приготовленных на их основе диагностикумов. Диагностикумы были испытаны в первую очередь с ЛПС *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter lari*, *Campylobacter coli* разных сероваров. Как видно из табл. 1, хеликобактерные диагностикумы не реагируют с ЛПС изученных видов сероваров других возбудителей кишечных инфекций, и следовательно, не имеют с их «К»- и О- антигенами перекрестных связей.

Хеликобактерные антигены разных штаммов были испытаны также с ранее разработанными диагностикумами для определения маркеров наиболее распространенных возбудителей кишечных инфекций (табл. 2). Во всех случаях реакция коаггутинации была отрицательной. Это свидетельствует о высокой специфичности хеликобактерных диагностикумов для РКА.

Реакцию коаггутинации на стекле можно проводить в полуколичественном варианте при разведении исследуемого материала. Чтобы не делать последовательных разведений исследуемого материала, можно воспользоваться шкалой, разработанной нами в специальных опытах постановки и учета РКА с двукратно разведенными ЛПС и оценкой реакции по 4-х крестовой системе (табл. 3). Так, если РКА оценивается на \pm , это означает, что антиген *H. pylori* может быть обнаружен в разведении биоматериала до 1:5, то есть титр антигена *H. pylori* равен 5; если РКА оценивается на +, то титр антигена составляет 1:10 и так далее.

В специальных исследованиях при сопоставлении результатов определения *H. pylori* у больных язвенной болезнью 12-перстной кишки с помощью быстрого уреазного теста и микроскопии биоптатов установлено, что РКА с титром специфических антигенов *H. pylori* с оценкой на « \pm » считается слабоположительной; «+» - положительной; «2+» и более - резко положительной реакцией. Чувствительность РКА диагностикумов для определения О-антигена составляла 10^2 - 10^3 мг/мл по ЛПС и лиофилизированным лизатам культур *H. pylori* соответственно.

Таблица 1

**Специфичность диагностикомов для выявления антигенов *H. pylori*
в реакции коаггутинации**

Культура бактерий, штамм	Антиген	Хеликобактерные диагностикомы				
		X ₁	Y ₁	Z ₂	131 ₂	159 ₂
<i>Helicobacter pylori</i> ATCC №700392	ЛПС	+	+	+	+	+
<i>Helicobacter pylori</i> ATCC №700392	лизат бактерий	+	+	+	+	+
<i>Helicobacter pylori</i> ATCC №700392	культ. бактерий	+	+	+	+	+
<i>Helicobacter pylori</i> NCTC №11637	лизат бактерий	+	+	+	+	+
<i>Helicobacter pylori</i> NCTC №11637	культ. бактерий	+	+	+	+	+
<i>Helicobacter pylori</i> NCTC №11639	лизат бактерий	+	+	+	+	+
<i>Helicobacter pylori</i> NCTC №11639	культ. бактерий	+	+	+	+	+
<i>Campylobacter jejuni</i> L 1	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i> L 2	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i> L 4	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i> L 6	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i> L 7	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter jejuni</i> L 5	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter coli</i> L 8	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter coli</i> L 20	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter lari</i> L 35	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Campylobacter lari</i> L 73	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i> №516	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i> №478	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Shigella newcastle</i> №1221	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Salmonella typhimurium</i> №415	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Salmonella choleraesuis</i>	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Salmonella enteritidis</i>	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Salmonella muenchen</i> №605	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Salmonella london</i>	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Salmonella anatum</i> №201	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> I c. №59	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Y. pseudotuberculosis</i> III c. №188	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> O:3 c. №5503	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> O:9 c. №915	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> O:7,8 c. №5512	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> O:4,33 c. №10767	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Y. enterocolitica</i> O:6,30 c. №5511	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Escherichia coli</i> O 157	ЛПС	-	-	-	-	-
<i>Legionella pneumophila</i> №2128	лизат бактерий	-	-	-	-	-
<i>Ps. aeruginosa</i> №4027	лизат бактерий	-	-	-	-	-
<i>Kl. pneumoniae</i> №62204	лизат бактерий	-	-	-	-	-

Метод был испытан в качестве быстрого неинвазивного теста при диагностике хеликобактериоза у больных язвенной болезнью 12-перстной кишки и неязвенной диспепсией в сопоставлении с «быстрым» уреазным тестом и бактериоскопией биоптатов. Установлена его высокая чувствительность (91%), которая не уступает уреазному тесту (91%) и микроскопии биоптатов (82%) ($p > 0.05$).

Как следует из полученных данных, диагностиком для выявления O-антигена *H. pylori* в РКА на стекле обладает высокой специфичностью и достаточной чувствительностью. По своей чувствительности РКА превосходит преципитационные методы и сопоставима с иммуноферментным анализом.

Таблица 2

Специфичность диагностикумов, используемых для выявления маркеров возбудителей кишечных инфекций в РКА с культурами *H. pylori*

Диагностикумы для выявления О-антигена	Культуры <i>H. pylori</i> ^{*)}			Контроль диагностикумов (без антигена)
	26695	11637	11639	
<i>Shigella flexneri</i> 2a	-	-	-	-
<i>Shigella flexneri</i> 1a	-	-	-	-
<i>Shigella sonnei</i>	-	-	-	-
<i>Shigella</i> 6 (newcastle)	-	-	-	-
<i>Campylobacter</i> (поливалентный)	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> серогруппы В	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> серогруппы С ₁	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> серогруппы С ₂	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> серогруппы Д	-	-	-	-
<i>Salmonella</i> серогруппы Е	-	-	-	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> I серовара	-	-	-	-
<i>Yersinia pseudotuberculosis</i> III серовара	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:3 серовара	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:9 серовара	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:7,8 серовара	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:4,33 серовара	-	-	-	-
<i>Yersinia enterocolitica</i> O:6,30 серовара	-	-	-	-
<i>Echerichia coli</i> O 157	-	-	-	-
<i>H. pylori</i> ATCC №26695	+	+	+	-
<i>H. pylori</i> NCTC №11637	+	+	+	-
<i>H. pylori</i> NCTC №11639	+	+	+	-

*) микробная масса *H. pylori* (30 млрд микр. тел/мл), прогретая при 100°C в течение 20 минут, в разведении 1:10.

Таблица 3

Соответствие результатов визуального учета РКА с определением титра ЛДС в исследуемом материале

Интенсивность РКА с биоматериалом	Соответствующие разведения ЛПС (из исходного 1 мг/мл)					
	0	5	10	20	40-60	80 и > ^{*)}
±		+				
+			+			
2+				+		
3+					+	
4+						+

*) обратные значения титров.

Закономерности циркуляции О-антигена *H. pylori* при инфекционном процессе, вызванном этим возбудителем. Впервые были исследованы закономерности циркуляции О-антигена *H. pylori* в динамике инфекционного процесса. В ходе проспективных исследований по выявлению антигенов *H. pylori* и других возбудителей кишечных инфекций в группе практически здоровых 7 добровольцев у одного из них удалось проследить в динамике возникновение острого гастрита с характерными клиническими проявлениями - тошнотой, изжогой, болями в области желудка и тонкого кишечника, головной болью, подъемом температуры до 38°. У этого больного исследовали циркуляцию О-антигена *H. pylori* до заболевания, в момент инфицирования, острого периода инфекционного процесса и в периоды ранней и поздней реконвалесценции. Изучено в общей сложности за 6 месяцев исследований 974 пробы фекалий и слюны. Антиген *H. pylori* у этого практически здорового человека до инфицирования не определялся (рис. 3). Специфический антиген был обнаружен первоначально в течение 2-х суток, затем выявлялся в незначительном количестве на протяжении 2-х недель. С появлением клинических симптомов заболевания и на протяжении всего острого периода маркер *H. pylori* обнаруживался в высоких титрах постоянно. Это продолжалось и после прекращения клинических проявлений заболевания в течение 2-х недель. В периоде реконвалесценции на протяжении одного месяца наблюдались кратковременные диспепсические явления, сопровождавшиеся небольшими подъемами уровня антигена в супернатантах фекалий и/или слюне. В течение второго месяца реконвалесценции антиген *H. pylori* обнаруживался периодически в низких титрах при отсутствии клинических проявлений заболевания. Полное освобождение организма от *H. pylori* наступило через 4 месяца после начала заболевания. Применение хеликобактерного диагностикума, таким образом, позволило провести динамическое наблюдение и получить данные об особенностях циркуляции антигена *H. pylori* в организме в различные периоды заболевания и определить полноту освобождения организма от возбудителя. Полученные данные свидетельствуют о высокой информативности метода определения антигена-маркера возбудителя хеликобактериоза для объективной оценки клинического течения заболевания: в наиболее тяжелый период инфекционного процесса отмечается наибольший подъем уровня антигена в биологических жидкостях, свидетельствующий, очевидно, о размножении возбудителя в организме. Несмотря на последующее уменьшение клинических проявлений болезни антиген *H. pylori* еще в течение некоторого времени продолжал выделяться из организма. Каждое вновь возникающее обострение сопровождалось подъемом уровня антигена. Отсутствие антигена после прекращения

клинических проявлений заболевания в исследуемых пробах свидетельствует о прекращении размножения возбудителя.

Таким образом, использование хеликобактерного диагностикума для РКА позволило провести длительное динамическое наблюдение на наличие маркера *H. pylori* при инфекционном процессе, установить тесную корреляцию частоты и уровня выявления антигена *H. pylori* с клиническими проявлениями заболевания и определить время прекращения размножения возбудителя в организме.

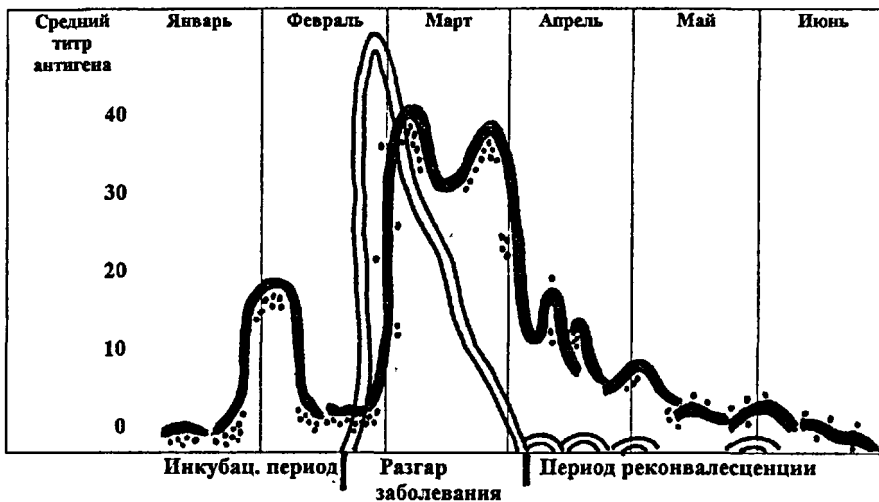


Рис. 3. Циркуляция антигенов *Helicobacter pylori* при инфекционном процессе.
 Обозначения: — - уровень О-антигена *H. pylori* в динамике;
 — — — - клинические проявления заболевания.

Частота встречаемости антигена *H. pylori* при заболеваниях желудочно-кишечного тракта. Реакцию коаггутинации на стекле ставили не только на выявление ЛПС *H. pylori*, но способом мультианализа - с одновременным определением О-антигенов основных возбудителей кишечных инфекций - шигелл Флекснера 1в, 2а, 6, шигелл Зонне; сальмонелл серогрупп В, С₁, С₂, Д, Е; иерсиний псевдотуберкулеза I и III сероваров, иерсиний энтероколита 0:3; 0:9; 0:7,8; 0:4,33; 0.6,30; кампилобактеров (поливалентный диагностикум); эшерихий 0157. Диагностикумы были разработаны и изготовлены в ГУ НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи РАМН. Показано, что О-антиген *H. pylori* при клиническом диагнозе кишечной инфекции обнаруживался в среднем у одной трети больных (33,2%). При этом сальмонеллезные антигены выявлены в 28,8% случаев, иерсиниозные у 15,1% больных.

Шигеллезные и кампилобактериозные антигены обнаружены соответственно в 5,8 и 5,1% случаев (табл. 4).

Таблица 4

Частота выявления антигенов *H. pylori* и других возбудителей кишечных инфекций в биологическом материале больных кишечными заболеваниями при различных клинических диагнозах (1999-2002 гг.)

Направляющий клинико-эпидемиологический диагноз и число больных, n	Число больных с положительной реакцией на наличие антигенов возбудителей, %				
	<i>H. pylori</i> n=492 1	шигеллы n=96 2	сальмонеллы n=432 3	кампилобактеры n=77 4	иерсинии n=118 5
А: Хеликобактериоз, n=150	24,6 ^{х)}	1,3	10,4	0	3,9
Б: Дизентерия, n=19	36,6	7,7	7,7	15,4	30,8
В: Сальмонеллез, n=73	32,0	0	34,0	0	0
Г: Кампилобактериоз, n=23	47,8	11,1	33,3	11,1	11,1
Д: Иерсиниоз, n=517	25,9	4,6	13,4	5,5	19,3
Е: КИНЭ, n=709	30,9	8,0	41,3	6,0	15,4
Ж: Всего, n=1491	33,2	5,8	28,8	5,1	15,1
З: Здоровые (контроль) (Вологда) n=223	15	5,8	4,4	2,7	4,0

^{х)} достоверные различия по χ^2 в группах: А₁-А₃ $\chi^2=10,259$, p=0,001; А₁-Г₁ $\chi^2=4,243$, p=0,039; Г₁-Г₄ $\chi^2=6,862$, p=0,009; Д₁-Д₅ $\chi^2=4,590$, p=0,032.

При анализе частоты выявления антигена *H. pylori* в группах больных, диагноз которых был поставлен не только на основании клинических симптомов заболевания, но и подтвержден выявлением маркеров соответствующих возбудителей в РКА (347 человек), маркер *H. pylori* выявлялся в разных этиологических группах от 65% до 83% (иерсиниоз, сальмонеллез, кампилобактериоз, шигеллез), в среднем в 74% случаев (табл. 5). Как видно из таблицы, примерно в одной трети случаев (29%) он обнаруживался в достаточно высоких титрах в группе больных, у которых антигены других патогенных возбудителей кишечных инфекций не были обнаружены (ОКИНЭ). Важно отметить, что *H. pylori* часто (в среднем в 74% случаев) выявлялся вместе с антигенами других возбудителей кишечных инфекций установленной этиологии: в виде двух антигенов в 30% случаев, трех антигенов - 13,1%, четырех антигенов - 6,1%, 5-6 антигенов 1,3 - 0,9% соответственно. Поскольку клиническая картина кишечных инфекций различной этиологии часто бывает сходной, а при хеликобактериозе и кампилобактериозе патогномичные симптомы отсутствуют, представляется необходимым проводить мультианализ, чтобы исследовать, по-возможности, полный

спектр маркеров возбудителей наиболее распространенных кишечных инфекций, учитывая при этом также высокую частоту смешанного инфицирования.

Таблица 5

Выявление антигенов *H. pylori* у больных острыми кишечными инфекциями с установленной этиологией

Группа больных с диагнозом ^{*)}	Частота выявления антигенов <i>H. pylori</i> в титрах 1:10 и выше ^{**)} %	Средний титр антигенов <i>H. pylori</i> ^{***)}	Частота выявления антигенов <i>H. pylori</i> (%) из числа положительных реакций в титрах:					
			5 ^{***)}	10	20	40	80	160 и выше
шигеллез, n=23	83	66,4	13	5	18	36	13	4
сальмонеллез, n=47	72	40,2	10	5	33	26	15	4
иерсиниоз, n=63	65	53,1	16	14	14	10	12	12
кампилобактериоз, n=31	77	81,8	4	12	16	32	24	8
Всего: n=164	74	60,4	10,7	9	20,2	26	16	7
ОКИНЭ, n=181	29	32,6	13	30	28	21	8	0
Итого: n=345	56,6							

Обозначения: *) – по данным клинических наблюдений и иммунологического (РКА) исследования;
 **) – из общего числа обследованных больных в группе;
 ***) – обратные значения титров.

На основании проведенных исследований было сделано заключение, что использование РКА с широким набором диагностикумов является оптимальным подходом для этиологической и дифференциальной диагностики кишечных заболеваний. Разработанный нами метод позволяет на 3-х предметных стеклах в течение 2-х часов установить этиологический и дифференциальный диагноз основных кишечных инфекций 16-ти нозологических форм, в том числе инфекции *H. pylori*, а также возможность микст-инфекций.

В дополнение к имеющимся данным литературы о высокой частоте обнаружения *H. pylori* при дисбиозах, вызванных условно-патогенными бактериями (О. Г. Лазаренко с соавт., 2000, П. Я. Григорьев с соавт., 1997, С. Н. Давыдова с соавт., 1999, А. А. Ильченко, 2000, М. Квина, 1999), а также вирусо-грибковыми ассоциациями (М. Л. Черницкая, 2000 г.), нами впервые установлено, что антиген *H. pylori* в подавляющем числе случаев выявляется в ассоциации с антигенами тех или

иных патогенных микроорганизмов - шигеллами, сальмонеллами, иерсиниями, кампилобактерами.

Мультианализ в реакции коаггутинации на планшетах. Нами были сконструированы диагностикумы для выявления антигенов различных возбудителей кишечных инфекций, в том числе *H. pylori*, в высокочувствительном варианте РКА на планшетах. Показана принципиальная возможность и целесообразность использования их для мультианализа с целью этиологической и дифференциальной диагностики. Чувствительность РКА на планшетах на 1-3 порядка превышает таковую для РКА на стекле и достигает 10^{-5} - 10^{-6} мг/мл по гомологичному ЛПС. Учет реакции через 1 сутки. Важно отметить, что метод РКА на планшете может быть использован для полуколичественного выявления О-антигенов возбудителей кишечных инфекций в биологических жидкостях больных.

Разработка тест-системы для выявления патогенетически значимых высокомолекулярных белков *H. pylori*. Одной из основных задач наших исследований являлась разработка тест-системы для выявления в биологических жидкостях больных антигенов высокомолекулярных белков *H. pylori*, поскольку протеины с молекулярной массой 120-140 кДа являются высокоспецифическими антигенами-маркерами цитотоксинпродуцирующих штаммов *H. pylori* (J. L. Telford et al, 1994, Z. Xiang et al., 1998).

Мы исходили из положения, что наличие в геноме возбудителя *H. pylori* генов *vac A* и *cag A*, контролирующих синтез соответствующих высокомолекулярных белков, и определение этих генов в культуре и биологическом материале еще не достаточно для заключения об этиологической и патогенетической роли *K pylori* в возникновении инфекционного процесса. Необходимо выявление способности *H. pylori* экспрессировать соответствующие белки в организме. Известно, что патогенные микроорганизмы, выращенные на искусственных питательных средах, не проявляют полностью свои потенциальные возможности метаболизма, и, лишь попадая в организм чувствительного хозяина, они приобретают способность образовывать капсулу, экспрессировать токсины, изменять антигенные и иммуногенные свойства (Домарадский И. В., 2000). Известно, что геном *H. pylori* обладает выраженной пластичностью. Мы предположили, что в чувствительном организме продукция патогенетически значимых антигенов может быть значительно более выраженной и полной. Важно при этом и их количественные отношения, свойственные клинически выраженной инфекции *H. pylori*. Исходя из этих предпосылок, нами был использован оригинальный способ получения материала, содержащего комплекс

высокомолекулярных белков *H. pylori*. В ранее проведенных исследованиях было показано (Белая Ю. А., Белая О. Ф., 2001), что 9-ти дневные куриные эмбрионы являются чувствительной моделью для размножения и токсического действия *K. pylori*. Нами были получены гомогенаты куриных эмбрионов, зараженных культурой *H. pylori* 11637 и погибших в течение 2-х суток, сыворотки против них, и на их основе изготовлены диагностикумы. После внутрижелточного заражения 9-ти дневных развивающихся куриных эмбрионов живой культурой *H. pylori* штамма NCTC 11637, содержащего *vac A* и *cag A* гены, происходит размножение и гибель эмбриона в течение 2-х суток. При исследовании белкового профиля гомогената этих эмбрионов (рис. 4А) обнаруживаются четко выраженные высокомолекулярные белки (ВМБ), являющиеся, несомненно, продуктом жизнедеятельности *H. pylori* в благоприятных условиях (богатая питательная среда, содержащая гемин эритроцитов, необходимая для размножения температура, влажность и микроаэрофильные условия). При иммунизации кроликов гомогенатом зараженных эмбрионов образуются антитела преимущественно к высокомолекулярным высокоиммуногенным белкам, что видно при постановке иммуноблота (рис. 4Б) На основе этой сыворотки был получен JgG антительный диагностикум для РКА, который способен выявлять высокомолекулярные белки *H. pylori* в биологических жидкостях. Специфичность диагностикума к ВМБ *H. pylori* обусловлена их высокой иммуногенностью и способностью белка А стафилококка Cowan I избирательно соединяться с JgG антителами иммунной сыворотки.

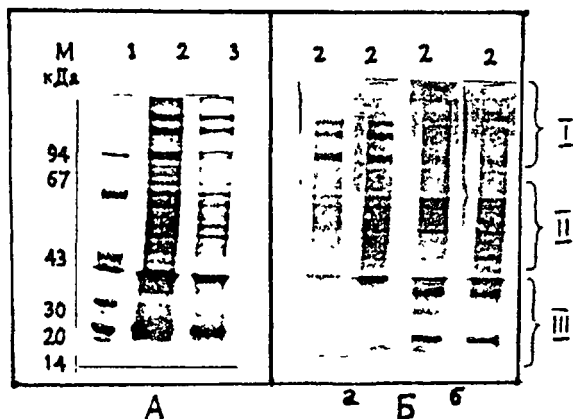


Рис 4. Белковый профиль (А) и иммуноблотинг (Б) антигенов *H. pylori*. 2, 3 - эмбриональная жидкость 9-ти дневного куриного эмбриона, зараженного культурой *H. pylori* штамма NCTC 11637 в дозе 10 0 и 5.0 мкл, а - сыворотка против эмбрионального гомогената; б - сыворотка против агаровой культуры *H. pylori* штамма NCTC 11637; I - группа протеинов с молекулярной массой 90-120 кД, II - 43-67 кД, Ш - 14-33 кД.

Получение диагностикума для определения высокомолекулярных белков *H. pylori* в РКА на планшетах. На основе сывороток к гомогенату эмбрионов, зараженного культурой *H. pylori* штамма NCTC 11637 (ЭГ37), изготовлен диагностикум для реакции коаггутинации на планшете. Оптимальным разведением сыворотки являлось 1:2000 (рис. 5). Этот диагностикум выявлял в исследуемом материале (ЭГ37) высокомолекулярные белки до разведения 1:800, что свидетельствовало о его достаточно высокой чувствительности.

	1	2	3	4	5	6	7	K ₁
I	○	○	○	○	○	○	○	○
II	○	○	○	○	○	○	○	○
III	○	○	○	○	○	○	●	●
IV	○	○	○	○	●	⦿	⦿	⦿
V	○	○	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿
K ₂	○	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿	⦿

Рис 5. Схема подбора оптимального разведения сыворотки для изготовления ВМБ-диагностикума.

Обозначения к рисунку:

Разведения тест-антигена: 1 - 1:16; 2 - 1:64; 3 - 1:256; 4 - 1:1024; 5 - 1:4096; 6 - 1:16384; 7 - 1:65536; K₁ - первый контроль (диагностикум + ФСБ).

Диагностикумы: I - диагностикум с конечным разведением сыворотки 1:500; II - 1:1000; III - 1:1500; IV - 1:2000; V - 1:3000; K₂ - второй контроль (тест-антиген + ФСБ).

Специфичность хеликобактерного ВМБ-диагностикума была испытана с биологическим материалом (слюна, кал) больных с хроническим гастритом и язвой двенадцатиперстной кишки в период обострения и ремиссии. При положительной реакции коаггутинации на стекле на О-антиген *H. pylori* в этих пробах выявлялась положительная РКА на планшетах с ВМБ-диагностикумом. При отсутствии О-антигена *H. pylori* реакция коаггутинации с ВМБ-диагностикумом отсутствовала. Пробы кала от больных шигеллезом, сальмонеллезом, иерсиниозом, кампилобактериозом, диагноз которых был поставлен на основе клинических данных и положительной РКА на термостабильные О-антигены соответствующих возбудителей, во всех случаях не содержали ВМБ *H. pylori*. В желточной жидкости некоторых куриных яиц обнаруживался О-антиген *H. pylori*. Однако, в желтке этих яиц реакция на ВМБ *H. pylori* была отрицательной. Это, вероятно, можно объяснить отсутствием

условий для размножения бактерий и экспрессии токсинов. Представленные в табл. 6 данные свидетельствуют о специфичности *H. pylori*-ВМБ-диагностикума

Таблица 6

Специфичность *H. pylori*-ВМБ диагностикума

Материал для исследования	Число проб	РКА на стекле с О-диагностикумом <i>H. pylori</i>	РКА с ВМБ-диагностикумом <i>H. pylori</i>
<u>Хронический гастрит,</u>			
<u>ЯБДК:</u>			
кал ¹⁾	135	+	+
слюна ¹⁾	120	+	+
кал ²⁾	95	-	-
слюна ²⁾	71	-	-
<u>ОКИ, кал:</u>			
шигеллез	102	-	-
сальмонеллез	132	-	-
нерсиниоз	135	-	-
кампилобактериоз	45	-	-
<u>желток куриного яйца</u>	5	+	-
<u>желток куриного яйца</u>	7	-	-

Обозначения: ¹⁾ период обострения; ²⁾ период ремиссии.

Выявление высокомолекулярных белков *H. pylori* у больных хроническим хеликобактериозом. Разработанный нами диагностикум для определения высокомолекулярных белков *H. pylori* был применен при систематических продолжительных (в течение 3-х лет) проспективных исследованиях у двух больных с хроническим хеликобактерным гастритом и язвенной болезнью 12-перстной кишки. Одновременно в пробах определяли О-антиген *H. pylori* в РКА на стекле, как показатель инфицирования *H. pylori*. В общей сложности от первого больного исследовано за этот период 200 проб слюны и 274 пробы кала. Установлено, что в период обострения заболевания у больного наблюдался значительный подъем титров высокомолекулярных белков *H. pylori*, тогда как в период реконвалесценции уровень этих белков снижался и практически не выявлялся в период ремиссии (рис. 6)

Второй больной, оперированный по поводу язвы желудка и страдающий периодическими обострениями неязвенного гастрита, был исследован на наличие О-антигена и высокомолекулярных белков в пробах слюны (73) и копрофильтрата (42). Повышенный уровень высокомолекулярных белков *H. pylori* отмечался в период обострения и снижался в период ремиссии (рис. 7).

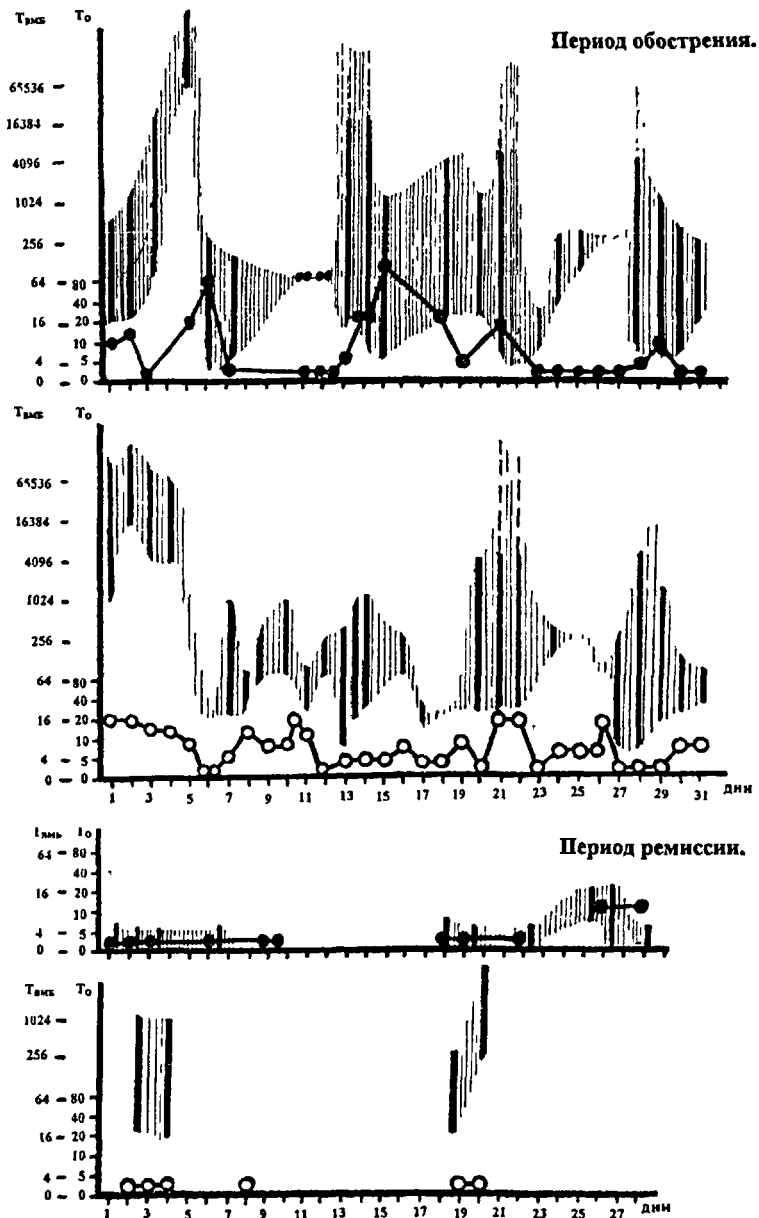


Рис. 6. Выявление О-антигена и ВМБ *H. pylori* у больного язвенной диспепсией в пробах кала и слюны реакцией коаггутинации.

Обозначения:

- — уровень О-антигена *H. pylori* в РКА в кале на стекле,
- — уровень О-антигена *H. pylori* в РКА в слюне на стекле,
- ||||| — уровень ВМБ *H. pylori* в РКА в кале и слюне на планшете,

T_{O} — титр О-антигена *H. pylori* в РКА на стекле,

$T_{ВМБ}$ — титр ВМБ в РКА на планшете

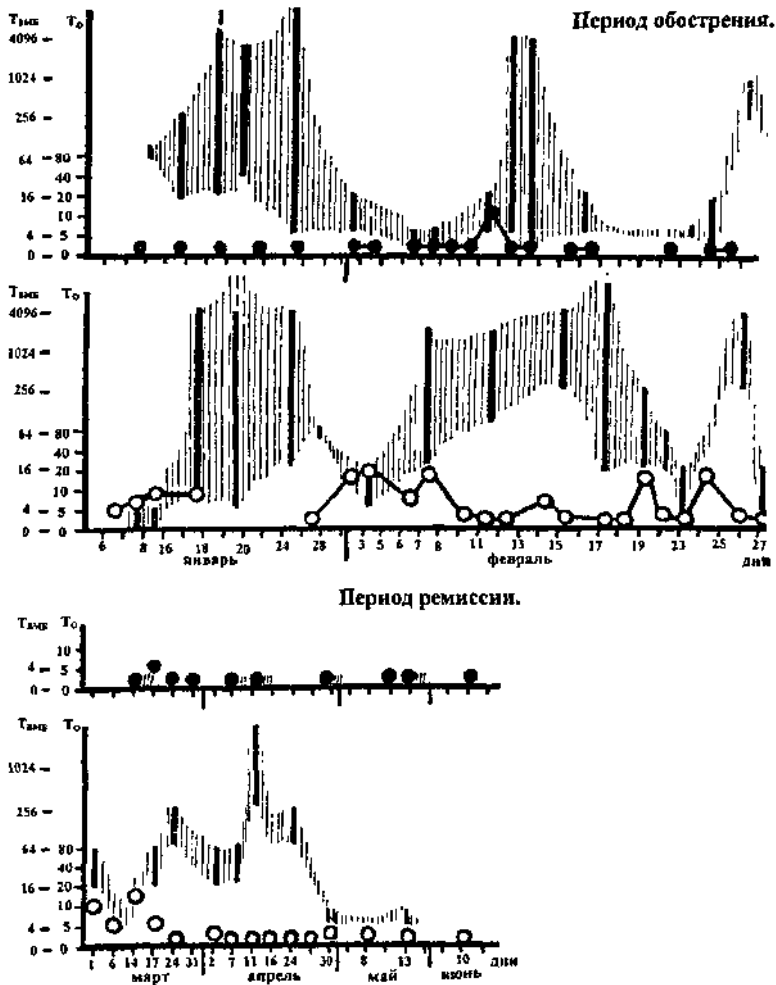


Рис 7. Выявление уровня О- и VMБ-антигенов Н. рулги у больного, оперированного по поводу язвы двенадцатиперстной кишки, в пробах кала и слюны реакцией коагуляциации. Обозначения те же, что и на рис. б.

Определение высокомолекулярных белков П. рулги у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки при разной эффективности антихеликобактерной терапии. Разработанный VMБ-диагностикум был апробирован на 3-х больных язвенной болезнью 12-перстной кишки в период обострения, до начала лечения, в течение всего курса лечения и в различные сроки после него.

Показано, что в период обострения до лечения у всех больных отмечался высокий уровень ВМБ-антигена в слюне и/или кале, который коррелировал с увеличением титров О-антигена возбудителя. В период лечения при эффективной эрадикационной терапии уровень О- и ВМБ-антигенов снижался (рис. 9), при неэффективной терапии оставался на высоком уровне (рис. 8).

Как видно из этих данных, реакция коаггутинации с ВМБ-диагностиком позволяет выявлять подъем уровня патогенетически значимых антигенов в период обострения, верифицировать инфицированность *H. pylori*, дает возможность уже в процессе лечения оценивать эффективность антихеликобактерной терапии.

Таким образом, показана принципиальная возможность получения и использования разработанного нами диагностикума для выявления высокомолекулярных белков *H. pylori* в биологическом материале больных, инфицированных этим микроорганизмом. Дальнейшие расширенные исследования с использованием ВМБ диагностикума для неинвазивного метода выявления высокомолекулярных белков, являющихся специфическими маркерами цитотоксинпродуцирующих штаммов *H. pylori*, позволит получить новые фактические данные о роли их в патогенезе, иммунитете и терапии заболеваний, ассоциированных с этим возбудителем.

Применение диагностикумов для выявления в РКА О-антигенов и высокомолекулярных белков, являющихся маркерами цитотоксин-продуцирующих штаммов *H. pylori*, непосредственно в биологическом материале от больных открывает широкие возможности для скрининга лиц, инфицированных *H. pylori*, наблюдения за ними в ходе заболевания, обострения и в период ремиссии, для ранней диагностики с целью своевременного назначения этиотропной терапии, объективной оценки тяжести течения и исхода заболевания, оценки полноты санации, определения бессимптомного бактерионосительства, оценки и эффективности антибактериальной терапии, в том числе для выявления смешанного инфицирования.

Обладая специфичностью и высокой чувствительностью, не уступающей (при постановке на стекле) чувствительности других иммунологических методов (например, ИФА) или значительно превосходящей ее (в модификации на планшете на 1-3 порядка), РКА имеет ряд преимуществ - это простота постановки и учета, доступность для малооснащенных лабораторий, быстрота получения ответа и рентабельность производства. Поэтому эта реакция может найти широкое применение в различных областях научных и прикладных исследований проблемы хеликобактериоза.

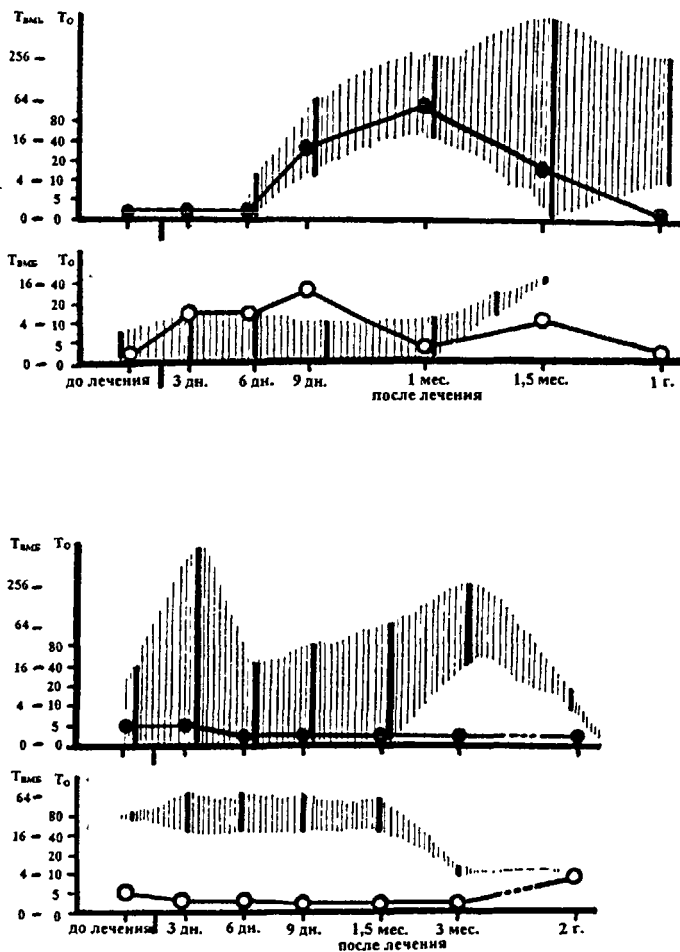


Рис 9. Антигены *H. pylori* у больного К. язвой двенадцатиперстной кишки до лечения и в различные сроки после начала терапии (пример эффективной терапии *H. pylori*).

Обозначения те же, что и на рис. 6.

ВЫВОДЫ

1. Проведен иммунофоретический анализ полного состава растворимых полисахаридных и белковых антигенов *H. pylori*, определена их электрофоретическая и диффузионная подвижность, иммунологическая специфичность. Впервые наряду с О-антигеном выявлен специфический поверхностный относительно термолabileльный полисахаридный антиген кислой природы, который по своим характеристикам может быть отнесен к К-антигенам *H. pylori*.

2. Разработан простой метод определения специфических полисахаридных антигенов *H. pylori* в биологическом материале (кал, слюна, сыворотка крови) с помощью реакции коагутинации (с чувствительностью 10^{-3} мг/мл по ЛПС на стекле и 10^{-5} мг/мл на иммунологических планшетах) для быстрой (2-24 ч) неинвазивной диагностики инфекции *H. pylori*, не уступающий по чувствительности методам микроскопии биоптатов и быстрого уреазного теста.
3. Разработан и апробирован полуколичественный специфический и чувствительный метод определения высокомолекулярных белков *H. pylori* в кале, слюне, сыворотке крови с использованием варианта реакции коагутинации на планшетах для быстрой (24 ч) неинвазивной диагностики активного инфекционного процесса, вызванного токсигенными штаммами *H. pylori*
4. Впервые в ходе длительных систематических обследований добровольцев определены закономерности циркуляции в организме специфических антигенов *H. pylori*, и установлена корреляция выраженности клинических проявлений заболевания с обнаружением антигенов *H. pylori* в слюне и/или кале. Антигены возбудителя появляются в слюне и/или кале кратковременно в течение 1-2 суток после заражения, не выявляются в инкубационном периоде (1-2 недели), обнаруживаются постоянно и в больших количествах в слюне и кале с первых дней клинических симптомов заболевания, на протяжении всего острого периода инфекционного процесса, и в течение 1-2 недель периода ранней реконвалесценции. В более поздние сроки периода реконвалесценции антигены обнаруживаются не постоянно или в низких титрах при периодических обострениях, полностью исчезая в период стойкой ремиссии.
5. Установлена высокая (от 65% до 83%) частота обнаружения антигенов *H. pylori* при острых бактериальных кишечных инфекциях (шигеллезе, сальмонеллезе, иерсиниозе). Впервые показано, что антигены-маркеры *H. pylori* более чем в половине случаев выявляются в ассоциации с одним или реже несколькими антигенами других возбудителей кишечных инфекций - чаще с маркерами сальмонелл и иерсиний, реже с антигенами шигелл и кампилобактеров.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Белая Ю. А., Петрухин В. Г., Белая О. Ф., Вахрамеева М. С., Жуховицкий В. Г., Ручкина И. Н. Особенности антигенного состава и иммуногенные свойства *Helicobacter pylori* // Ж. клин. лаб. диагн. -1999. - № 11. - с. 12-13.
2. Белая Ю. А., Евдокимов В. В., Белая О. Ф., Петрухин В. Г., Вахрамеева М. С. *Helicobacter pylori* и смешанные инфекции // Мат. науч. конф. «Клинические перспективы в инфектологии». - С.-Петербург. - 2001. - с. 27.
3. Белая Ю. А., Белая О. Ф., Петрухин В. Г., Вахрамеева М. С. *Helicobacter pylori*: эффективный метод антигенодиагностики // Мат. конф. «Национальные дни лабораторной медицины России». - Москва. - 2001, № 9, - с. 38.
4. Белая О. Ф., Герасимова И. Е., Лиенко А. Б., Каншина Н. Н., Чернова М. Е., Набокова М. Ю., Микерин С. М., Вахрамеева М. С. Оценка эффективности терапии ОКИ по элиминации антигенов возбудителя // Мат. межд. конф. «Клиническое исследование лекарственных средств». -Москва. - 2001, - с. 15.
5. Вахрамеева М. С, Белая О. Ф., Петрухин В. Г., Белая Ю. А. Выявление *Helicobacter pylori* реакцией коагутинации при кишечных заболеваниях и в пищевых продуктах // Мат. науч. конф. «Проблемы инфекционной патологии в регионах Сибири, Дальнего Востока и Крайнего Севера». - Новосибирск. - 2002. - с. 236.
6. Белая Ю. А., Белая О. Ф., Евдокимов В. В., Вахрамеева М. С, Петрухин В. Г. Антигенодиагностика болезней, ассоциированных с *Helicobacter pylori* // Мат. VІn Съезда микробиологов, эпидемиологов, паразитологов. - Москва. - 2002, т. 3.-С.229.
7. Белая Ю. А., Вахрамеева М. С, Белый Ю. Ф., Белая О. Ф., Петрухин В. Г. «Способ получения тест-системы для выявления цитотоксинассоциированных белков *Helicobacter pylori* в биологическом материале инфицированных лиц реакцией коагутинации» // Патент по заявке № 200212 7480 от 15.10.2002.
8. Белая Ю. А., Петрухин В. Г., Вахрамеева М. С. Летальное действие *Helicobacter pylori* на модели развивающихся куриных эмбрионов // Мат. конф. «Инфекционные и паразитарные болезни в современном обществе. Клиническо-лабораторное обеспечение инфектологии». -Москва. - 2003. - с. 24.
9. Белая Ю. А., Белая О. Ф., Евдокимов В. В., Вахрамеева М. С, Петрухин В. Г. Неинвазивные методы иммунодиагностики при язвенной болезни двенадцатиперстной кишки // Мат. конф. «Инфекционные и паразитарные

болезни в современном обществе. Клиническо-лабораторное обеспечение инфектологии». - Москва. - 2003. - с. 23.

10. Белая Ю. А., Петрухин В. Г., Вахрамеева М. С., Рубцов И. В., Белая О. Ф. Диагностикум для определения О-антигена *V. cholerae* реакцией коаггутинации // Мат. конф. «Инфекционные и паразитарные болезни в современном обществе. Клиническо-лабораторное обеспечение инфектологии». - Москва. - 2003. - с. 20.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'М. Вахрамеева'.

**Типография ООО «Телер»
127299 Москва, ул. Космонавта Волкова, 12
Лицензия на полиграфическую деятельность ПД № 00595**

Подписано в печать 03.03.2004 г. Формат 60x90 1/16. Тираж 100 экз.
Бумага «Снегурочка» 1,2 л. Заказ № 147

9 - 30 78