

Мониторинг первичной антибиотикорезистентности штаммов *Helicobacter pylori*, выделенных в республике Татарстан в 2008–2013 гг.

О.К. Поздеев^{1,2}, Л.Г. Морозова¹, А.О. Поздеева¹, Ю.В. Валеева², П.Е. Гуляев²

¹ ГБОУ ДПО «Казанская государственная медицинская академия» Минздрава России, Казань, Россия

² ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава России, Казань, Россия

Изучена частота обнаружения *H. pylori* в биоптатах слизистой антрального отдела желудка у 869 больных гастритами и язвенной болезнью желудка в Республике Татарстан в течение 2008–2013 гг. Инфицированность среди обследованных пациентов составила 45,5%. Изучение чувствительности изолятов *H. pylori* к антибактериальным препаратам проводилось диско-диффузионным методом. Установлено, что на протяжении всех лет исследования бактерии, выделенные от пациентов в обеих группах, проявляли высокую чувствительность к кларитромицину, амоксициллину, ципрофлоксацину

и тетрациклину. В 2008 г. количество устойчивых к кларитромицину штаммов, выделенных от пациентов с гастритами, составило в среднем 3,8%, в 2013 г. — 4,7%, количество чувствительных к метронидазолу составила соответственно 57,4 и 37%. Среди изолятов *H. pylori*, выделенных от больных язвенной болезнью желудка, устойчивыми к кларитромицину в 2008 г. были 5,3%, в 2013 г. — 8,4%, к метронидазолу — 30,3 и 24,6% соответственно.

Ключевые слова: *H. pylori*, антибиотикорезистентность, диско-диффузионный метод.

Primary Antimicrobial Resistance among *Helicobacter pylori* Isolated in the Republic of Tatarstan in the 2008-2013

O.K. Pozdeev^{1,2}, L.G. Morozova¹, A.O. Pozdeeva¹, Yu.V. Valeeva², P.E. Gulyaev²

¹ Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia

² Kazan State Medical University, Kazan, Russia

This study was aimed to determine isolation rate of *H. pylori* from gastric mucosal biopsies in 869 patients with chronic gastritis and gastric peptic ulcers in Republic of Tatarstan during the 2008–2013. A total of 45.5% of gastric biopsy samples were positive for *H. pylori*. Antimicrobial susceptibility testing for *H. pylori* was performed by disk diffusion method. Over the study period, *H. pylori* isolated from patients in the both populations were susceptible to clarithromycin, amoxicillin, ciprofloxacin, and tetracycline. In 2008 and 2013, clarithromy-

cin resistance among isolates from patients with chronic gastritis was 3.8% and 4.7%, respectively. In contrast, the only 57.4% and 37% isolates were susceptible to metronidazole. In 2008 and 2013, clarithromycin resistance among *H. pylori* isolated from patients with gastric peptic ulcer was 5.3% and 8.4%, respectively; metronidazole resistance was 30.3% and 24.6%, respectively.

Key words: *H. pylori*, antimicrobial resistance, disk diffusion method.

Контактный адрес:

Павел Евгеньевич Гуляев

Эл. почта: gulyaev.pavel90@gmail.com

Колонизация организма человека *Helicobacter pylori* рассматривается как одна из наиболее распространенных инфекций человека. Исследования, проведенные в разных странах, показывают, что инфицированность *H. pylori* населения в отдельных регионах может достигать 9% [1, 2]. В Российской Федерации в 2008–2010 гг. в различных регионах она составляла 56–88% [3, 4].

Относительно роли микроорганизма в развитии заболеваний человека существует большой объем данных, в том числе и противоречивых. К настоящему времени можно считать установленной этиологическую значимость *H. pylori* в развитии 65–80% случаев антрального неатрофического хронического гастрита (типа В), 12–15% случаев — *H. pylori*-ассоциированной язвенной болезни, 0,8–1% случаев дистального рака желудка и 0,5% случаев MALT-лимфомы желудка низкой степени злокачественности [5–7]. *H. pylori*-ассоциированные заболевания требуют проведения медицинских мероприятий, направленных на элиминацию этого микроорганизма. Однако, с началом внедрения схем эрадикационной терапии гастроэнтерологи стали сталкиваться с неудачами при ее проведении, обусловленной в большинстве случаев быстро развивающейся антибиотикорезистентностью *H. pylori* [8–10]. К сожалению, до настоящего времени в РФ не проводят многоцентровые исследования по изучению распространения устойчивости хеликобактера. В результате, эрадикационную терапию обычно назначают эмпирически, руководствуясь, в лучшем случае, рекомендациями «Маастрихтских Консенсусов». Таким образом, изучение динамики распространения антибиотикорезистентности среди различных изолятов *H. pylori* в различных регионах РФ представляет научно-практический интерес.

Цель исследования — изучить динамику антибиотикорезистентности у изолятов *H. pylori*, выделенных в г. Казани и г. Набережные Челны среди пациентов с различной гастроуденальной патологией.

Материал и методы исследования

Нами обследовано 869 пациентов в возрасте от 19 до 84 лет (из них мужчин — 551, женщин — 318), в разное время обращавшихся в Центр хирургии язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки при ГАУЗ «Городская больница № 11» (г. Казань), гастроэнтерологическое отделение ГАУЗ «Городская больница № 7» (г. Казань), лечебно-диагностический центр ГАУЗ «Госпиталь для ветеранов войны» (г. Казань), «Клинический госпиталь медико-санитарной части МВД РТ» (г. Казань), ГАУЗ «Городская больница № 2» (г. Набережные

Челны) для эндоскопического исследования верхних отделов желудочно-кишечного тракта.

Все пациенты имели клинические признаки гастрита и язвы желудка, подтвержденные данными фиброгастродуоденоскопии. Всем обратившимся диагноз был поставлен первично и ранее они не получали эрадикационной терапии.

Материалом для исследования служили биоптаты слизистой оболочки, отобранные у больных во время проведения ФЭГДС из антрального отдела желудка и 12-перстной кишки. Образцы отбирали из области патологии и прилегающей визуально неизменной слизистой.

От каждого больного брали по два биоптата слизистой желудка средним весом 5 мг, первый — для первичной микроскопии в мазках, второй — для бактериологических исследований. Эту величину учитывали при расчете уровня обсемененности. Биоптаты помещали в 3–5 мл полужидкой тиогликолевой транспортной среды и немедленно доставляли в лабораторию. Для первичной микроскопии один биоптат стерильно разделяли на 2 части. Из одной части готовили два «раздавленных» мазка, не слишком растирая, чтобы не нарушить естественного расположения бактерий, клеточных элементов и слизи, фиксировали над пламенем горелки и окрашивали разведенным фуксином Пфайфера и по Граму. Мазки просматривали в светооптическом микроскопе под иммерсией. Вторую часть биоптата исследовали в Слю-тесте на уреазную активность по методу, предложенному Б.Д. Старостиним и А.В. Петрутиком [11], модифицированному внесением в пробирки под пробку индикаторных бумажек, пропитанных реактивом Круппа для выявления аммиака. Каждую пробу сопровождали контролем среды на отсутствие неспецифического щелочения. Пробы инкубировали от 30–60 мин до 3–24 ч при 37 °С.

Для выделения культур *H. pylori* второй биоптат гомогенизировали в 1 мл физиологического раствора и высевали на плотные питательные среды в объеме одной капли (0,05 мл). В качестве питательных сред использовали эритрит-кровяной агар с эритроцитами барана и с 2 мкг/мл амфотерицина В (Oxoid Ltd, Великобритания). В исследованиях, проведенных после 2012 года, эритрит-кровяной агар дополняли внесением 5% эмбриональной телячьей сыворотки (Serva, Германия). Посевы инкубировали в течение 5 суток в микроаэрофильных условиях (10% CO₂, 5% O₂) при 37 °С. Колонии *H. pylori* имели характерный вид: мелкие, прозрачные, диаметром 0,5–1 мм, влажные или суховатые, иногда окруженные небольшой зоной гемолиза. У выделенных культур опре-

деляли подвижность в препарате «раздавленная капля» с помощью фазово-контрастной микроскопии с масляной иммерсией. Просматривали не менее 10–12 полей зрения и выявляли бактерии с характерной «винтообразной» подвижностью. Биохимическую идентификацию проводили по наличию оксидазной, каталазной и уреазной активности.

Факт присутствия *H. pylori* подтверждали по совокупности положительных результатов бактериоскопического, бактериологического и биохимического исследования. Как положительный результат также рассматривали случаи обнаружения в мазках-отпечатках грамтрицательных палочек характерной морфологии и положительных результатов Сю-теста. Как отсутствие *H. pylori* рассматривали данные, включающие отрицательные результаты бактериоскопии, выделения культур бактерий и положительный Сю-тест с биоптатом, так как Сю-тест достаточно неспецифичен. Он может быть положительным в присутствии других микроорганизмов (протеев, стафилококков, кандид и др.).

Степень обсеменности биоптата определяли путем подсчета колоний, выросших на плотных средах. При этом исходили из следующих расчетов: биоптат весит 5 мг, его растирали в присутствии 1 мл жидкости, т.е. получали разведение 1:200, засеивали на питательные среды по 1 капле (0,05 мл) суспензии. Уровень обсеменности представлял собой частное от деления количества выросших колоний на объем гомогената, умноженное на объем физиологического раствора, в котором гомогенизировали биоптат. Обнаружение в мазках до 20 микробных клеток *H. pylori* рассматривали как слабую обсеменность (+), от 20 до 50 — как умеренную (++) , более 50 — как высокую степень обсеменности (+++).

Определение чувствительности штаммов *H. pylori* к антибактериальным препаратам проводили диско-диффузионным методом. Следует отметить, что данный метод определения чувствительности *H. pylori* не является стандартизированным. В лабораторном определении чувствительности *H. pylori* большинство исследователей отдает предпочтение методу серийных разведений в агаре, но технически он сложен [12, 13]. В своих исследованиях мы руководствовались рекомендациями С. McNulty с соавт. [14].

Использовали диски с метронидазолом (5 мкг), кларитромицином (2 мкг), эритромицином (5 мкг), тетрациклином (30 мкг), амоксициллином (10 мкг), ципрофлоксацином (5 мкг), цефтриаксоном (30 мкг) и фуразолидоном (1 мкг) производства HiMedia Lab. (Индия).

После идентификации культуры готовили бактериальную взвесь, соответствующую стандарту мутности по шкале Мак-Фарланда 0,5 ($\sim 1,5 \times 10^8$ микробных тел/мл). Затем 1 мл взвеси наносили на кровяной агар и равномерно распределяли. Диски вносили из расчета шести дисков на чашку Петри и культивировали в течение пяти суток в микроаэрофильных условиях при 37 °С.

Полученные данные подвергали статистической обработке с вычислением средней ошибки показателя *m* с использованием программы «Microsoft Office Excel 2007». Статистически значимыми считали результаты при $p < 0,05$.

Результаты и обсуждение

Среди 561 обследованного больного с язвенной болезнью желудка *H. pylori* был обнаружен в 263 (47,1%) случаях. Обследование 308 пациентов, страдающих хроническими гастритами, выявило присутствие *H. pylori* в 132 (42,9%) биоптатах. Всего бактерии были обнаружены у 45,5% обследованных пациентов. Статистически достоверной разницы между частотой обнаружения *H. pylori* у мужчин и женщин обнаружено не было (соответственно $75,6 \pm 3,3$ и $73,4 \pm 5,5\%$). Частота их выделения в зависимости от возраста представлена в табл. 1.

При обследовании пациентов, страдающих язвенной болезнью желудка, обсемененность биоптатов слизистой желудка была низкой, тогда как у больных хроническим гастритом преобладала высокая степень обсемененности биоптатов. Результаты определения уровней обсемененности у обследованных пациентов представлены в табл. 2.

Учитывая длительность проводимых исследований, не представлялось возможным сгруппировать результаты исследований в одинаковые выборки, но число исследованных изолятов ни в одной из групп не было меньше 10, а полученные данные по чувствительности каждого выделенного изолята представляли сумму результатов, полученных на трех чашках.

Результаты определения чувствительности выделенных изолятов *H. pylori* показали, что на протяжении всех лет исследования бактерии, выделенные от пациентов в обеих группах, проявляли высокую чувствительность к кларитромицину, амоксициллину, ципрофлоксацину и тетрациклину. Устойчивость к метронидазолу варьировала в пределах 22,4–30,3%.

Изоляты бактерий, выделенные из антрального отдела слизистой желудка пациентов, страдающих хроническим гастритом, на протяжении последних 6 лет сохранили достаточно высокую чувствительность. В частности, она не изменилась в отношении

Таблица 1. Частота обнаружения *H. pylori* в зависимости от возраста обследованных пациентов

Возраст, лет	Количество обследованных	Число <i>Hp</i> (+) пациентов	Число <i>Hp</i> (-) пациентов	Частота обнаружения <i>H. pylori</i> , %
≤24	49	21	28	42,9
25–44	158	86	75	54,4
45–64	295	131	164	44,4
≥65	367	157	210	42,7
Всего	869	395	474	45,5

Таблица 2. Уровни обсемененности *H. pylori* биоптатов слизистой оболочки желудка у пациентов, страдающих хроническим гастритом и язвенной болезнью желудка (КОЕ/биоптат)

Диагноз пациентов	Уровни обсемененности		
	низкий (10 ² –10 ³)	высокий (10 ⁴ –10 ⁵)	очень высокий (>10 ⁵)
Язвенная болезнь	–	57	206
Хронический гастрит	107	25	–

Таблица 3. Чувствительность к антибактериальным препаратам изолятов *H. pylori*, выделенных из биоптатов антральной части желудка пациентов, страдающих хроническим гастритом (в %)

Годы	КЛМ			АМО			ЦФЛ			ТЕТ			МТЗ		
	Ч	УР	Р	Ч	УР	Р									
2008	80,8	15,4	3,8	89,3	7,9	2,8	82,1	15,5	2,4	83,5	12,2	4,3	57,4	20,2	22,4
2009	86,7	10,6	2,7	89,6	7,3	3,1	83,2	12,9	3,9	79,9	13,3	6,8	50,1	20,6	29,3
2010	85,4	10,0	4,6	84,6	12,4	3,0	80,5	11,9	7,6	91,4	5,1	3,5	44,6	30,1	25,3
2011	81,9	14,0	4,1	84,9	11,6	3,5	80,6	15,0	4,4	84,3	12,3	3,4	40,1	29,8	30,1
2012	86,1	10,4	3,5	86,7	11,0	2,3	81,8	13,7	4,5	80,7	14,8	4,5	39,3	30,9	29,8
2013	86,0	9,3	4,7	85,2	11,9	2,9	83,7	11,5	4,8	78,4	15,7	5,9	37,05	35,5	27,4

Примечание: Ч – чувствительные штаммы; УР – умеренно резистентные штаммы; Р – резистентные штаммы. КЛМ – кларитромицин, АМО – амоксициллин, ЦФЛ – ципрофлоксацин, ТЕТ – тетрациклин, МТЗ – метронидазол.

кларитромицина и ципрофлоксацина. Обращает на себя внимание рост числа штаммов, резистентных к метронидазолу. Следует отметить, что изначально резистентность к этому препарату была достаточно низкой и составляла 22,4% (табл. 3).

Несколько иными были результаты определения чувствительности изолятов *H. pylori*, выделенных от больных, страдающих язвенной болезнью желудка. Изначально обращал на себя внимание факт более низких уровней чувствительности выделенных штаммов *H. pylori* по сравнению с таковыми, выделенными от больных хроническим гастритом. Изученные изоляты были более чувствительны к кларитромицину, амоксициллину, ципрофлоксацину и тетрациклину, но проявляли более высокую устойчивость к метронидазолу (табл. 4).

Проведенные исследования показывают, что полученные нами результаты изучения чувствительности изолятов *H. pylori* в целом совпадают с данными, полученными ранее в РФ [15, 16].

Следует отметить, что важной проблемой эрадикации *H. pylori* является выявление штаммов, проявляющих полирезистентность, в первую очередь к метронидазолу и кларитромицину, поскольку оба широко применяют в эрадикационных схемах.

В 2005 г. среди изолятов *H. pylori*, выделенных от пациентов, страдающих хроническим гастритом, в Казани были выявлены штаммы, резистентные к кларитромицину (3,5%) [17]. По результатам наших исследований можно констатировать, что к настоящему времени их количество возросло незначительно. Установлено, что среди изученных изолятов резистентность к метронидазолу оста-

Таблица 4. Чувствительность к антибактериальным препаратам изолятов *H. pylori*, выделенных из биоптатов антральной части желудка пациентов, страдающих язвенной болезнью желудка (в %)

Годы	КЛМ			АМО			ЦФЛ			ТЕТ			МТЗ		
	Ч	УР	Р	Ч	УР	Р	Ч	УР	Р	Ч	УР	Р	Ч	УР	Р
2008	72,6	22,1	5,3	74,3	15,3	10,4	78,3	11,6	10,1	69,6	28,1	2,3	53,1	16,6	30,3
2009	75,8	18,1	6,1	77,6	13,3	9,1	72,2	16,4	11,4	71,3	25,8	2,9	53,8	16,4	29,8
2010	72,4	20,1	7,5	71,1	19,1	9,8	80,3	7,5	12,2	72,4	26,3	1,3	56,3	15,2	28,5
2011	75,5	19,1	5,4	73,9	12,4	13,7	72,4	16,3	11,3	70,2	25,8	4,0	54,2	16,3	29,5
2012	74,3	18,8	6,9	75,4	12,9	11,7	74,1	14,2	11,7	66,9	30,7	2,4	56,7	18,4	24,9
2013	76,8	14,8	8,4	68,3	19,5	12,2	71,8	16,2	12,0	67,3	28,5	4,2	57,5	17,9	24,6

Примечание. Ч – чувствительные штаммы; УР – умеренно резистентные штаммы; Р – резистентные штаммы. КЛМ – кларитромицин, АМО – амоксициллин, ЦФЛ – ципрофлоксацин, ТЕТ – тетрациклин, МТЗ – метронидазол.

васаль в пределах 22,4–30,3%, что ниже уровней в ряде других регионов РФ [15]. Факт снижения резистентности к метронидазолу среди изолятов *H. pylori*, выделенных от больных язвенной болезнью, может быть связан с тем, что резистентность к метронидазолу не является необратимой. Показано, что анаэробные условия восстанавливают чувствительность к метронидазолу у прежде резистентных штаммов *H. pylori* [18, 19]. С другой стороны, возможно, это связано со снижением частоты применения пероральных лекарственных форм метронидазола в РФ.

Таким образом, проведенные нами исследования показали, что с 2008 по 2013 гг. устойчивость изолятов *H. pylori*, выделенных от больных хроническим гастритом и язвенной болезнью желудка в Республике Татарстан, возросла незначительно и не дает оснований ожидать появления значительного числа полирезистентных штаммов. Тем не менее, следует принимать во внимание рост числа умеренно резистентных штаммов к большинству исследованных препаратов, что вызывает определенную настороженность при их активном применении в схемах эрадикационной терапии.

Литература

- van Amsterdam K., van Vliet A.H., Kusters J.G., van der Ende A. Of microbe and man: determinants of *Helicobacter pylori*-related diseases. *FEMS Microbiol Rev* 2006; 30:131-56.
- Ford A.C., Axon A.T.R. Epidemiology of *Helicobacter* infection and public health implications. *Helicobacter* 2010; 15:1-6.
- Щербаков П.Л. Эпидемиология инфекции *H.pylori*. *Helicobacter pylori*: революция в гастроэнтерологии. Ивашкин В.Т., Мегро Ф., Лапина Т.Л. - М.: «Триада-Х»; 1999. с. 14-20.
- Решетников О.В., Курилович С.А., Кротов С.А., Кротова В.А. Мониторинг инфекции, вызванной *Helicobacter pylori*, в Новосибирске. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии* 2008; 1:99-100.
- Kuipers E.J. *Helicobacter pylori* and the risk and management of associated diseases: gastritis, ulcer disease, atrophic gastritis and gastric cancer. *Aliment Pharmacol Ther* 1997; 11(1):71-88.
- Marshall B. *Helicobacter pylori*: 20 years on. *Clin Med* 2002; 2:147-52.
- Hussain S.A., Hamid S. *Helicobacter pylori* in humans: Where are we now? *Adv Biomed Res* 2014; 3:63.
- Mégraud F., Occhialini A., Doermann H.P. Resistance of *Helicobacter pylori* to macrolides and nitroimidazole compounds. The current situation. *J Physiol Pharmacol* 1997; 48(4):25-38.
- O'Connor A., Taneike I., Nami A., et al. *Helicobacter pylori* resistance rates for levofloxacin, tetracycline and rifabutin among Irish isolates at a reference centre. *Ir J Med Sci* 2013; 182:693-5.
- Ierardi E., Giorgio F., Losurdo G., Di Leo A., Principi M. How antibiotic resistances could change *Helicobacter pylori* treatment: A matter of geography? *World J Gastroenterol* 2013; 19:8168-80.
- Старостин Б.Д., Петрутик А.В. Экспресс-метод диагностики инфицированности *Campylobacter pylori* желудка и двенадцатиперстной кишки. *Клиническая медицина* 1989; 67:50-2.
- Osato M.S. Antimicrobial susceptibility testing for *Helicobacter pylori*: sensitivity test results and their clinical relevance. *Current Pharmaceutical Design* 2000; 6:1545-55.
- Alarcón T., Domingo D., López-Brea M. Discrepancies between E-test and agar dilution methods for testing metronidazole susceptibility of *Helicobacter pylori*. *J Clin Microbiol* 1998; 36:1165-6.
- McNulty C., Owen R., Tompkins D., et al. *Helicobacter pylori* susceptibility testing by disc diffusion. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49:601-9.

15. Кудрявцева Л.В., Исаков В.А., Иваников И.О. и др. Резистентность *H. pylori* к метронидазолу, кларитромицину и амоксициллину в Москве, Санкт-Петербурге и Абакане в 2001 г. Педиатрия 2002; (2, приложение): 61-3.
16. Кудрявцева Л.В. Биологические свойства *Helicobacter pylori*. Альманах клинической медицины 2006; XIV:39-46.
17. Исаева Г.Ш., Поздеев О.К., Муффер К. Чувствительность клинических изолятов *Helicobacter pylori* к антибактериальным препаратам. Клин микробиол антимикроб химиотер 2005; 7 (прил. 1):30-1.
18. Smith M.A., Edwards D.I. The influence of microaerophilia and anaerobiosis on metronidazole uptake in *Helicobacter pylori*. J Antimicrob Chemother 1995; 36:453-61.
19. Abdi Y.M., Young K.A., Rampton D.S., et al. Comparison of the effects of anaerobic and micro-aerophilic incubation on resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole. J Med Microbiol 1999; 48:407-10.