

Чувствительность к антибактериальным препаратам изолятов *Helicobacter pylori*, выделенных от пациентов с предраковыми и онкологическими заболеваниями желудка

Л.Г. Морозова¹, О.К. Поздеев^{1,2}, А.О. Поздеева¹,
Л.В. Кипенская¹, Е.В. Муравьева³

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

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

³ ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Минздрава Республики Татарстан, Казань, Россия

Изучена частота и уровень инфицированности *H. pylori* слизистой оболочки желудка среди пациентов с предраковыми (аденоматозный и гиперпластический полип, очаговая гипертрофия и эрозия) и онкологическими заболеваниями желудка (аденокарцинома, перстневидно-клеточный рак и карциноид). *H. pylori* был обнаружен у 75,5±3,1% обследованных, при этом среди пациентов со злокачественными образованиями — у 72,2±7,5%. У этих больных выявлена очень высокая степень обсемененности (10^4 – 10^5 КОЕ/биоптат). У пациентов с предраковыми заболева-

ниями преобладали средние и высокие степени обсемененности слизистой оболочки антрального отдела желудка. Исследованы уровни чувствительности выделенных штаммов *H. pylori* к антибактериальным препаратам. Чувствительными к кларитромицину, амоксициллину, метронидазолу, тетрациклину и ципрофлоксацину были 85, 79, 32, 65 и 90% штаммов *H. pylori* соответственно.

Ключевые слова: онкологические заболевания желудка, предрак, *Helicobacter pylori*, антибиотикорезистентность.

Antimicrobial Susceptibility of *Helicobacter pylori* Isolates from Patients with Gastric Cancer and Precancer

L.G. Morozova¹, O.K. Pozdeev^{1,2}, A.O. Pozdeeva¹, L.V. Kipenskaya¹, E.V. Muravyeva³

¹ Kazan State Medical Academy, Kazan, Russia

² Kazan State Medical University, Kazan, Russia

³ Republican Clinical Oncology Dispensary, Kazan, Russia

This study was aimed to assess incidence and grade of colonization of gastric mucosa with *Helicobacter pylori* in patients with precancerous conditions (adenomatous polyp, hyperplastic polyp, focal hypertrophy, erosions) and gastric cancer (adenocarcinoma, signet ring cell carcinoma, carcinoid). The incidence of *H. pylori* infection was 75.5±3.1% in the overall patient population and 72.2±7.5% among patients with gastric cancer. The patients with gastric cancer had a high grade of coloni-

zation (10^4 – 10^5 CFU/biopsy). Most patients with precancerous conditions had intermediate and high grades of antral mucosa colonization with *H. pylori*. Antimicrobial susceptibility of *H. pylori* was determined by disk diffusion method. Susceptibility rates of *H. pylori* to clarithromycin, amoxicillin, metronidazole, tetracycline, and ciprofloxacin were 85%, 79%, 32%, 65%, and 90%, respectively.

Key words: gastric cancer, precancer, *Helicobacter pylori*, antimicrobial resistance.

Контактный адрес:

Лариса Викторовна Кипенская

Эл. почта: lkipensk@gmail.com

Введение

В 1994 году ВОЗ и Международное агентство по изучению рака (IARC) признали *Helicobacter pylori* канцерогеном I порядка [1]. Позднее в ряде исследований было показано, что проведение ранней эрадикационной терапии существенно снижает частоту развития *рака желудка* (РЖ) [2, 3]. В то же время были получены сведения, указывающие на отсутствие подобного влияния эрадикационной терапии [4, 5]. Тем не менее, большинство авторов полагают, что проведение эффективной эрадикационной терапии в определенной степени снижает риск развития РЖ, но не способно полностью предотвратить его развитие [6].

В настоящее время не вызывает сомнений этиологическая значимость *H. pylori* в развитии большинства случаев антрального неатрофического хронического гастрита (типа В), способного приводить к атрофии слизистой желудка и кишечной метаплазии, признанных предраковыми состояниями. Установлена корреляция между степенью развития *H. pylori*-ассоциированного гастрита и выраженностью кишечной метаплазии [7], показана обратимость кишечной метаплазии после успешной эрадикационной терапии [8]. Также показано, что элиминация *H. pylori* может не только предотвращать развитие и прогрессирование атрофии эпителия [9], но также возможно обратное развитие атрофии слизистой оболочки, хотя этот процесс отмечен не у всех пациентов и лишь через несколько лет после антигеликобактериальной терапии [8, 10, 11].

Цель исследования — изучить частоту инфицированности *H. pylori* слизистой оболочки желудка (СОЖ) среди пациентов с предраковыми и онкологическими заболеваниями желудка и определить чувствительность выделенных штаммов к антибактериальным препаратам.

Материал и методы

Обследовано 196 пациентов, обратившихся в отделение эндоскопии ГАУЗ «Республиканский клинический онкологический диспансер» Минздрава Республики Татарстан для эндоскопического исследования верхних отделов желудочно-кишечного тракта. Среди них: 83 человека с полипами желудка (у 28 диагностирован аденоматозный, у 55 — гиперпластический полипы), 35 — с очаговой гипертрофией, 42 — с эрозиями (у 34 диагностированы воспалительно-гиперпластические, у 8 — поверхностные). Также было обследовано 36 онкологических больных, среди которых у 30 диагностирована аденокарцинома желудка, у 5 — перстневидно-клеточный рак и у 1 пациента — карциноид.

От каждого больного брали по два биоптата СОЖ по 5 мг: первый — для первичной микроскопии в мазках, второй — для бактериологических исследований. Эту величину учитывали при расчете уровней обсемененности. Биоптаты помещали в 3–5 мл полужидкой тиогликолевой транспортной среды и немедленно доставляли в лабораторию. Для первичной микроскопии один биоптат стерильно разделяли на две части. Из одной части готовили два «раздавленных» мазка, фиксировали над пламенем горелки и окрашивали разведенным фуксином Пфайфера и по Граму. Мазки просматривали в световом микроскопе под иммерсией. Вторую часть биоптата исследовали в Слю-тесте на уреазную активность по методу, предложенному Б.Д. Старостиным и А.В. Петрутиком [12], модифицируя его внесением в пробирки под пробку индикаторных бумажек, пропитанных реактивом Крушпа для выявления аммиака. Каждую пробу сопровождали контролем среды на отсутствие неспецифического щелочения. Пробы инкубировали в течение от 30–60 минут до 3–24 часов при 37 °С.

Для выделения *H. pylori* второй биоптат гомогенизировали в 1 мл физиологического раствора хлорида натрия и высевали на плотные питательные среды в объеме одной капли (0,05 мл). В качестве питательных сред использовали эритрит-кровяной агар с эритроцитами барана 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 определяли подвижность в препарате «раздавленная капля» при 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 бактериологического, бактериологического и биохимического исследования. Как положительный результат рассматривали также случаи обнаружения в мазках-отпечатках грамтрицательных палочек характерной морфологии и положительных результатов Слю-теста. Как отсутствие *H. pylori* рассматривали данные, включающие отрицательные результа-

Таблица 1. Частота обнаружения *H. pylori* в биоптатах СОЖ у больных в зависимости от патологии

Вид патологии	Количество больных, инфицированных <i>H. pylori</i> , n (%)
Рак желудка	26 (72,2±7,5)
Аденоматозный полип	22 (78,6±7,8)
Гиперпластический полип	34 (61,8±6,6)
Эрозия	38 (90,1±4,6)
Очаговая гипертрофия	28 (80±6,8)

Таблица 2. Частота обнаружения *H. pylori* в биоптатах СОЖ в зависимости от места взятия биоптата

Вид патологии	Количество случаев выделения <i>H. pylori</i> , n (%)	
	область патологии	прилегающая слизистая
Аденоматозный полип	16 (72,7±9,5)	20 (90,9±6,1)
Гиперпластический полип	24 (72,7±7,75)	31 (93,9±4,2)
Эрозия	34 (89,5±4,98)	34 (94,0±3,9)
Очаговая гипертрофия	22 (78,6±7,8)	27 (96,4±3,5)
Рак желудка	23 (88,5±6,3)	26 (100)

ты бактериоскопии, выделения культур бактерий и положительный Слю-тест с биоптатом, так как Слю-тест достаточно неспецифичен (он может быть положительным в присутствии других микроорганизмов: протеев, стафилококков, кандид и др.).

Степень обсемененности биоптата определяли путем подсчета колоний, выросших на плотных средах. При этом исходили из следующих расчетов: биоптат массой 5 мг растирали в присутствии 1 мл жидкости, т. е. получали разведение 1:200, засекали на питательные среды по 1 капле (0,05 мл) суспензии. Соответственно уровень обсемененности равнялся частному от деления количества выросших колоний на объем гомогената, умноженному на объем физиологического раствора, в котором гомогенизировали биоптат. Обнаружение в мазках до 20 микробных клеток *H. pylori* рассматривали как слабую обсемененность (+), от 20 до 50 — как умеренную (++), более 50 — высокую степень обсемененности (+++).

Определение чувствительности штаммов *H. pylori* к антибактериальным препаратам проводили диско-диффузионным методом. Следует отметить, что до настоящего времени отсутствует стандартизованный метод определения чувствительности *H. pylori* к антибиотикам. В своих исследованиях мы руководствовались рекомендациями С. McNulty с соавт. [13]. В работе использовали диски с метронидазолом (5 мкг), кларитромицином (2 мкг), эритромицином (5 мкг), тетрациклином (30 мкг), амоксициллином (10 мкг), ципрофлоксацином (5 мкг)

и фуразолидоном (1 мкг) производства HiMedia Lab (Индия).

После идентификации культуры готовили бактериальную взвесь, соответствующую стандарту мутности по шкале Мак-Фарланда 0,5 ($1,5 \times 10^8$ микробных тел/мл). Затем 1 мл взвеси наносили на кровяной агар и равномерно распределяли по чашке Петри. Диски вносили из расчета шести дисков на чашку Петри и культивировали пять суток в микроаэрофильных условиях при 37 °С. Затем с помощью штангенциркуля измеряли диаметры зон задержки роста вокруг дисков и сопоставляли с данными таблиц, содержащих пограничные значения диаметров зон задержки роста для устойчивых, умеренно устойчивых и чувствительных штаммов.

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

Проведенные исследования показали, что среди 196 обследованных пациентов *H. pylori* обнаружен у 148 (75,5±3,1%). Частота обнаружения была практически одинаковой у мужчин и женщин и составила соответственно 73,1±4,6 и 70,7±3,95%.

Наиболее часто бактерии выявляли у пациентов с эрозиями, наименьшую — у больных с гиперпластическими полипами (табл. 1).

Таблица 3. Уровни обсемененности *H. pylori* биоптатов СОЖ в зависимости от вида патологии, КОЕ/биоптат

Диагноз	Количество биоптатов		
	Умеренная обсемененность (10 ¹ –10 ²)	Высокая обсемененность (10 ³ –10 ⁴)	Очень высокая обсемененность (10 ⁴ –10 ⁵)
Полипы*	23	24	8
Эрозии	12	25	1
Очаговые гипертрофии	11	13	4
Рак желудка	5	7	14

Примечание: * — аденоматозные и гиперпластические полипы

Таблица 4. Распределение выделенных изолятов *H. pylori* по чувствительности к антибактериальным препаратам, %

Антибиотик	Чувствительные	Умеренно устойчивые	Устойчивые
Кларитромицин	85,6±11,7	10,4±3,2	3,5±0,7
Амоксициллин	78,5±12,3	21,5±3,6	0
Ципрофлоксацин	91,6±10,9	8,4±2,7	0
Тетрациклин	64,3±8,6	35,7±6,1	0
Фуразолидон	41,7±6,3	58,3±8,3	0
Метронидазол	32,0±5,1	32,3±8,7	35,8±9,2

Также была изучена зависимость частоты выделения бактерий от места забора биоптата. Проведенные исследования выявили определенные различия в частоте выделения *H. pylori* из очага поражения и области визуально неизменной СОЖ, но они не достигали границ статистической достоверности (табл. 2)

Определение уровней обсемененности биоптатов показало, что у больных раком желудка высокая частота обнаружения *H. pylori* коррелировала с высокой степенью обсемененности (10⁴–10⁵ КОЕ/биоптат). У пациентов с полипами, эрозиями и очаговыми гипертрофиями СОЖ на фоне высокой частоты выделения *H. pylori* высокие уровни обсеменности биоптатов наблюдали реже. У большинства больных отмечали средние уровни обсеменности СОЖ (табл. 3).

Изучение чувствительности к антибиотикам у выделенных штаммов *H. pylori* показало, что они чувствительны к кларитромицину, амоксициллину и ципрофлоксацину в 86, 79 и 92% случаев соответственно (табл. 4). Чувствительными к тетрациклину были 65% штаммов. Наименьшую чувствительность бактерии проявляли к метронидазолу (32%).

Заключение

Значение эрадикационной терапии в профилактике рака желудка остается предметом дискуссии. Вполне логично полагать, что элиминация *H. pylori* снижает выраженность воспалительного процесса и, соответственно, атрофического гастрита, что, в свою очередь, снижает риск развития кишечной метаплазии [14]. В пользу этого предположения, впервые выдвинутого Р. Согеа в 1995 г., говорят результаты ряда исследований, различающихся между собой лишь длительностью наблюдений за пациентами [4, 5, 15]. Кроме того, показано, что проведение эрадикационной терапии пациентам, перенесшим оперативное удаление опухоли, также снижает риск ее рецидива [16]. В то же время, проведенные недавно ретроспективные исследования указывают на отсутствие какого-либо влияния предшествующей эрадикации *H. pylori* на риск развития рака желудка [17, 18]. Указанные разногласия указывают на необходимость поиска адекватных прогностических маркеров возможного развития рака желудка среди пациентов с целью разработки показаний для проведения эрадикационной терапии.

Литература

1. C Working Group: Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon, 7-14 June 1994. C Monogr Eval Carcinog Risks Hum 1994; 61:1-241.
2. Wu C.Y., Kuo K.N., Wu M.S., et al. Early *Helicobacter pylori* eradication decreases risk of gastric cancer in patients with peptic ulcer disease. *Gastroenterology* 2009; 137:1641-8.
3. Ma J.L., Zhang L., Brown L.M., et al. Fifteen-year effects of *Helicobacter pylori*, garlic, and vitamin treatments on gastric cancer incidence and mortality. *J Natl Cancer Inst* 2012; 104:488-92.
4. Correa P., Fontham E.T., Bravo J.C., et al. Chemoprevention of gastric dysplasia: randomized trial of antioxidant supplements and anti-*Helicobacter pylori* therapy. *J Natl Cancer Inst* 2000; 92:1881-8.
5. Fuccio L., Zagari R.M., Eusebi L.H., et al. Meta-analysis: can *Helicobacter pylori* eradication treatment reduce the risk for gastric cancer? *Ann Intern Med* 2009; 151:121-8.
6. Cavaleiro-Pinto M., Peleteiro B., Lunet N., Barros H. *Helicobacter pylori* infection and gastric cardia cancer: systematic review and meta-analysis. *Cancer Causes Control* 2011; 22:375-87.
7. Eidt S., Stolte M. Prevalence of intestinal metaplasia in *Helicobacter pylori* gastritis. *Scand J Gastroenterol* 1991; 29: 607-10.
8. Kokkola A., Sipponen P., Pautelin. H., et al. The effect of *Helicobacter pylori* eradication on the natural course of atrophic gastritis with dysplasia. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16:515-20.
9. Sakaki N., Kozswa H., Egea N., et al. Ten-year prospective follow-up study on the relationship between *Helicobacter pylori* infection and progression of atrophic gastritis, particularly assessed by endoscopic findings. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16:198-203.
10. Fichman S., Niv Y. Histological changes in the gastric mucosa after *Helicobacter pylori* eradication. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 2004; 16:1183-88.
11. Hojo M., Miwa H., Ohkusa T., et. al. Alteration of histological gastritis after cure of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther* 2002; 16:1923-32.
12. Старостин Б.Д., Петрутик А.В. Экспресс-метод диагностики инфицированности *Campylobacter pylori* желудка и двенадцатиперстной кишки. *Клиническая медицина* 1989; 67:50-2.
13. McNulty C., Owen R., Tompkins D., et al. *Helicobacter pylori* susceptibility testing by disc diffusion. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49:601-9.
14. Correa P. *Helicobacter pylori* and gastric carcinogenesis. *Am J Surg Pathol* 1995; 19 (Suppl 1): S37-S43.
15. Take S., Mizuno M., Ishiki K., et al. The long-term risk of gastric cancer after the successful eradication of *Helicobacter pylori*. *J Gastroenterol* 2011; 46:318-24.
16. Fukase K., Kato M., Kikuchi S., et al. Effect of eradication of *Helicobacter pylori* on incidence of metachronous gastric carcinoma after endoscopic resection of early gastric cancer: an open-label, randomised controlled trial. *Lancet* 2008; 372:392-7.
17. Maehata Y., Nakamura S., Fujisawa K., et al. Long-term effect of *Helicobacter pylori* eradication on the development of metachronous gastric cancer after endoscopic resection of early gastric cancer. *Gastrointest Endosc* 2012; 75:39-46.
18. Kato M., Nishida T., Yamamoto K., et al. Scheduled endoscopic surveillance controls secondary cancer after curative endoscopic resection for early gastric cancer: a multicentre retrospective cohort study by Osaka University ESD study group. *Gut* 2013; 62:1425-32.