



В.Г. Передерій, Ю.О. Володічева,  
Ю.Г. Кузенко, І.Г. Костенко

Національний медичний університет  
імені О.О. Богомольця, Київ

## Бактеріологічний метод визначення чутливості *Helicobacter pylori* до антибактеріальних препаратів

### Ключові слова

Бактеріологічний метод, *Helicobacter pylori*, чутливість, метронідазол, орнідазол, кларитроміцин.

Поширеність інфекції *Helicobacter pylori* та її безпосередній зв'язок з розвитком захворювань шлунка і дванадцятипалої кишки (ДПК) (хронічним гастритом, виразковою хворобою, MALT та раком шлунка) зумовили актуальність цієї проблеми, важливою умовою ефективного рішення якої є якісна діагностика та лікування гелікобактеріозу.

Останніми роками розроблено значну кількість методів діагностики *H. pylori*. Головними критеріями оцінки будь-якого методу, зокрема і виявлення *H. pylori*, є його чутливість та специфічність. Найбільшу специфічність (100 %) серед існуючих методів має бактеріологічний (культуральний) метод, що дало підстави вважати його «золотим стандартом» діагностики. На жаль, чутливість бактеріологічного методу є нижчою, ніж його специфічність (від 75 до 90 %), і залежить від оснащення мікробіологічної лабораторії та кваліфікації оператора [6, 8].

Культуральний метод дає змогу не тільки ідентифікувати мікроорганізми, а й вивчити чинники патогенності, сформувати банк штамів для епідеміологічних досліджень (заморожені бактерії зберігаються протягом 5–7 років за температури 70 °С). Тільки за допомогою цього методу можна перевірити отримані штами на резистентність до антибактеріальних препаратів (АБП), яка останнім часом є основною проблемою успішного лікування інфекцій [4, 6].

Згідно з даними різних дослідників, ефективність офіційно рекомендованих схем антигелікобактерної терапії (АГБТ) становить 65–

96 %, але в більшості випадків залежить від чутливості *H. pylori* до АБП [12]. У практичному плані найбільш важливими є дані щодо резистентності *H. pylori* до нітроїмідазолів (метронідазол) і макролідів (кларитроміцин) [5, 15, 18]. Саме ці АБП використовують у найефективніших схемах терапії *H. pylori*-інфекції, які запропоновані Маастрихтським консенсусом III (2005) [11].

За даними мультицентрових досліджень, первинна резистентність до метронідазолу становить 20–40 % у США та країнах Європи, а в країнах з низьким економічним рівнем є досить високою — від 50 до 80 % [9, 13, 17, 18]. Первинна резистентність до кларитроміцину варіює у межах від 0 до 25 % (у країнах Східної Європи середній показник — 9,9 %) (Megraud та Lehours, 2007, Zullo та співавт., 2007). Резистентність *H. pylori* до двох антибіотиків — метронідазолу та кларитроміцину — в Європі зазвичай є меншою, ніж 10 % (Koletzko та співавт., 2006). Вторинна резистентність до метронідазолу та кларитроміцину, після неефективної терапії цими препаратами, значно вище і становить: до метронідазолу — 65–75 % у розвинених країнах та до 80–100 % — у країнах з низьким економічним рівнем, а резистентність до кларитроміцину — близько 60 % (Heep, Kist, 2000).

У нашому дослідженні ми визначали чутливість *H. pylori* до препаратів групи нітроїмідазолів (метронідазол, орнідазол), а також до кларитроміцину. Орнідазол — похідне нітроїмідазолу пролонгованої дії (період напіввиведення — близько 13 год). Наявність у його будові атома

хлору визначає унікальні фармакокінетичні якості препарату, завдяки яким він має перевагу перед метронідазолом [2, 3].

### Матеріали та методи

Основні критерії включення пацієнтів у дослідження: наявність клінічних та ендоскопічних ознак пептичної виразки дванадцятипалої кишки (ПВДПК) у фазі загострення, наявність *H. pylori*-позитивного <sup>13</sup>C-сечовинного дихально-го тесту та позитивного СЛО-тесту у кожного пацієнта для запобігання отриманню хибнопозитивних результатів.

У дослідження було залучено 69 хворих віком від 18 до 65 років з діагнозом *H. pylori*-асоційована ПВДПК у фазі загострення. Діагноз *H. pylori*-асоційованої дуоденальної виразки встановлювали шляхом загальноклінічного обстеження пацієнтів, проведення <sup>13</sup>C-сечовинного дихального тесту, верхньої ендоскопії з прицільною біопсією слизової оболонки шлунка та проведення СЛО-тесту. Також усім хворим були виконані лабораторні дослідження (загальний білок, білкові фракції, білірубін, АЛТ, АСТ, креатинін, сечовина та ін.), загальний аналіз сечі, ЕКГ. Для виключення супутніх захворювань з боку паренхіматозних органів черевної порожнини всім хворим проводили ультразвукове дослідження органів черевної порожнини з використанням ультразвукового сканера Aloka SSD 5000.

Визначення *H. pylori* проводили за допомогою <sup>13</sup>C-сечовинного дихального тесту на приладі не-дисперсної інфрачервоної спектроскопії NDIRS (IRIS, Wagner Analysen Technik, Worpswede). Значення показника DOB (delta over baseline) понад 3,5 % свідчило про наявність *H. pylori*-інфекції.

За допомогою відеоезофагогастроуденоскопа EVIS-140 (Olympus, Японія) обстежували верхні відділи травного каналу з оглядом стравоходу, шлунка та ДПК. Під час проведення верхньої ендоскопії виконували прицільну біопсію слизової оболонки тіла шлунка на відстані 8 см від кардії по великій кривизні (1 біоптат), антрального відділу на відстані 2–3 см від пілорусу уздовж великої кривизни (1 біоптат), цибулини ДПК (1 біоптат) для проведення СЛО-тесту і подальшого виділення *H. pylori* з біоптатів слизової оболонки шлунка за допомогою бактеріологічного методу [7].

Два біоптати слизової оболонки антрального і фундального відділів шлунка, отримані при ендоскопічному обстеженні, занурювали в транспортне середовище Portagerm Pylori фірми bioMerieux (Франція) і протягом 2–3 год доставляли в бактеріологічну лабораторію, де біоптати вилучали і подрібнювали на гомогенізаторі. По-

сів гомогенізованої тканини робили на готове селективне середовище одноразового використання, розлите в чашки Петрі фірми bioMerieux, та на неселективне середовище (агар «Колумбія»). Після цього проводили стерилізацію в автоклаві протягом 15 хв за температури 120 °С. При охолодженні додавали антимікробний розчин, що містив антибактеріальні та протигрибкові препарати, які не діють на *H. pylori*, але пригнічують ріст супутньої мікрофлори. Чашки з посівами поміщали у спеціальний бокс — анаеростат і проводили інкубацію за температури 37 °С та вологості 98 % у мікроаерофільних умовах протягом 3–10 діб. Для створення мікроаерофільної атмосфери використовували газогенераторні пакети, які входять до складу діагностичних наборів для виділення та ідентифікації бактерій. На неселективному середовищі на 3-тю–5-ту добу при первинному посіві і на 2-гу добу при пересівах чистої культури *H. pylori* формує круглі гладенькі прозорі колонії, подібні до крапель роси, діаметром 1–3 мм. На селективному поживному середовищі колонії *H. pylori* мають золотисто-жовтий колір. З метою ідентифікації культури з колоній готували мазок, фарбували його за методом Грама та досліджували за допомогою фазово-контрастної мікроскопії. Після ідентифікації суспензію колоній поміщали у відповідну тест-систему для визначення уреазної активності. Для визначення наявності каталази, оксидази, продукції сірководню, утворення нітратів, індолу, розщеплення глюкози використовували біохімічні тест-системи фірми bioMerieux (Api Campy test).

Ідентифікацію бактерій проводили за морфологічними та біохімічними властивостями. До виду *H. pylori* відносили бактерії з високою уреазною активністю, які були оксидазо-, каталазо і фосфатазопозитивні, утворювали сірководень, не розщеплювали глюкози і не утворювали нітрата та індол.

З метою виявлення та порівняння чутливості *H. pylori* до препаратів групи нітроїмідазолу (метронідазол, орнідазол), а також для визначення чутливості виділених штамів *H. pylori* до кларитроміцину використовували метод розведення в агарі. Згідно з рекомендаціями Clinical Laboratory Standard Institute (США) метод ділюції в агарі вважають золотим стандартом для визначення чутливості *H. pylori* до антибактеріальних препаратів *in vitro* [11, 16]. Цей метод ґрунтується на визначенні найменшої концентрації антибіотика із ряду серійних подвійних розведень, внесеного в агар, який може гальмувати ріст мікроорганізму. Ця найменша концентрація називається мінімальною пригнічуючою концентрацією (МПК) і дає змогу розподілити шта-

Таблиця. Резистентність штамів *H. pylori* до препаратів групи нітроїмідазолів, виділених у хворих на *H. pylori*-асоційовану дуоденальну виразку (n = 69) до лікування

Антибіотик	Чутливі штами	Помірно чутливі	Резистентні
Метронідазол	0	11 (15,9 %)	6 (8,7 %)
Орнідазол	9 (13,1 %)	6 (8,7 %)	2 (2,9 %)
Метронідазол + орнідазол	15 (21,7 %)	6 (8,7 %)	14 (20,3 %)
Разом	24 (34,8 %)	23 (33,3 %)	22 (31,9 %)

ми на чутливі, помірно резистентні та резистентні. Для визначення чутливості *H. pylori* до антибіотиків використовували щільне середовище фірми bioMerieux подвійної концентрації. Антибіотики розводили в пробірках на стерильному фізіологічному розчині так, щоб у кінцевих розведеннях була подвійна доза щодо тієї, яка повинна міститися в середовищі. Внаслідок одержували середовища з вмістом антибіотиків 1,25; 2,5; 5; 10; 20 та 40 мкг/мл. На поверхню вже щільного середовища наносили мікропіпеткою 0,05 мл суспензії культури, яка за стандартом мутності містила 100 тис. клітин у 1 мл. Для досягнення сприятливого для росту культури мікроаерофільного середовища планшети розміщували у спеціальні бокси bioMerieux і культивували за температури 37 °С протягом 48 год. За наявності росту в контрольному гнізді відмічали концентрації, при яких ріст *H. pylori* затримувався.

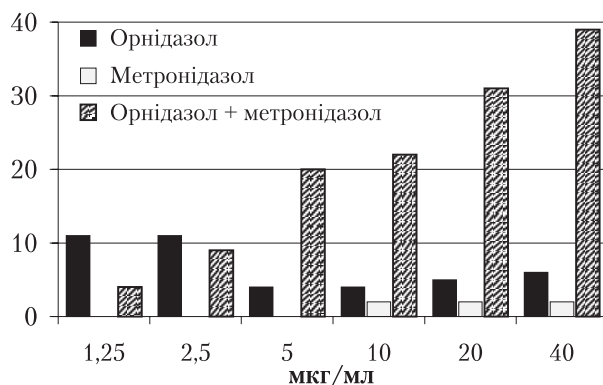
### Результати та обговорення

Показники загального та біохімічного аналізу крові в усіх хворих були у межах норми. На початку дослідження в усіх хворих під час проведення верхньої ендоскопії виявили гостру стадію активності пептичної виразки ДПК. У всіх хворих був позитивний показник <sup>13</sup>С-сечовинного дихального тесту (від 4,5 до 46 %) та СЛО-тест.

При дослідженні чутливості *H. pylori* до препаратів групи нітроїмідазолів методом серійних розведень в агарі виявили, що діапазон МПК досліджуваних АБП становить 1,25–40,0 мкг/мл. Залежно від чутливості *H. pylori* до нітроїмідазолів штами було розподілено на чутливі (1,25–5,0 мкг/мл), помірно чутливі (10–40 мкг/кг) та резистентні – наявність росту культури в усіх розведеннях (таблиця).

Визначено, що орнідазол вже у найменших концентраціях (МПК – 1,25–2,5–5 мкг/мл) має вищу активність щодо *H. pylori* порівняно з метронідазолом (p = 0,006 за критерієм Мак Нимара; рисунок). Такі малі (субінгібувальні) концентрації антибактеріального препарату можуть мати захисний ефект, збільшувати захоплення та лізис бактерій фагоцитами [1].

При дослідженні 11,6 % штамів не виявлено перехресної резистентності між орнідазолом та

Рисунок. Чутливість штамів *H. pylori* до препаратів групи нітроїмідазолів in vitro

метронідазолом (8,7 % досліджуваних штамів були чутливими лише до орнідазолу і резистентними до метронідазолу, а 2,9 % штамів, навпаки, чутливими лише до метронідазолу), тобто перехресна резистентність між препаратами групи нітроїмідазолів є не завжди (p < 0,0001). За результатами нашого дослідження резистентність до препаратів групи нітроїмідазолів становила 31,9 %.

Резистентність до кларитроміцину виявлено при дослідженні 7 (10,1 %) штамів *H. pylori*. Подвійну резистентність до антибіотиків (як до метронідазолу, так і до кларитроміцину) встановлено в 4 (5,8 %) випадках.

### Висновки

Бактеріологічний метод є визначальним для виявлення чутливості *H. pylori* до антибактеріальних препаратів і дає змогу оцінити доцільність їх подальшого використання у схемах антигелікобактерної терапії.

Серед хворих на *H. pylori*-асоційовану дуоденальну виразку резистентність до препаратів групи нітроїмідазолів становить 31,9 %.

У 11,6 % випадків не спостерігали перехресної резистентності *H. pylori* до препаратів групи нітроїмідазолів.

Резистентність до кларитроміцину становить 10,1 %, що не перевищує припустимий 20 % бар'єр для його призначення в схемах антигелікобактерної терапії першої лінії.

Подвійна резистентність *H. pylori* до антибактеріальних препаратів становить 5,8 %.

## Список літератури

1. Катцунг Б.Г. Базисная и клиническая фармакология.— СПб: Диалект Бином, 2007.— Т. 2.— С. 648.
2. Нейко Є.М., Вишиванок В.Ю. Ефективність орнідазолу при Нр-асоційованій виразковій хворобі // Сучасна гастроентерологія.— 2007.— № 1 (33).— С. 4—7.
3. Передерій В.Г., Володичева Ю.О., Ткач С.М. Ефективність орнідазолу як компонента першої лінії антихелікобактерної терапії у хворих на виразкову хворобу дванадцятипалої кишки // Матер. XV з'їзду терапевтів України.— К, 2004.— С. 233—235.
4. Сарсенбаева А.С., Игнатов Г.Л., Воротникова С.В. Методы диагностики Helicobacter pylori: Учеб. пособие.— Челябинск, 2005.
5. Саблін О.А., Ильчишина Т.А. Проблема резистентности Helicobacter pylori к кларитромицину // Гастроэнтерология.— 2009.— № 2.— Прилож. Consilium medicum.— С. 4—8.
6. Фаденко Г.Д. Методы диагностики Helicobacter pylori: современные возможности в 2010 году // Здоров'я України. Тематичний номер. Гастроентерологія.— 2010.— С. 8—10.
7. Bayerdoffer E., Oertel H., Lehn N. et al. Topographic association between active gastritis and Campylobacter pylori colonization // J. Clin. Pathol.— 1989.— Vol. 42.— P. 834—839.
8. Glupczynski Y. Microbiological and serological diagnostic tests for Helicobacter pylori: an overview // Br. Med. Bulletin.— 1998.— Vol. 54 (N 1).— P. 175—186.
9. Glupczynski Y., Megraud F., Lopez-Brea M., Andersen L. European Multicentre Survey of in Vitro Antimicrobial Resistance in Helicobacter pylori // Eur. J Clin Microbiol. Infect. Dis.— 2001.— Vol. 20.— P. 820—823.
10. Heep M., Kist M., Strobel S. et al. Secondary resistance among 554 isolates of Helicobacter pylori after failure of therapy // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.— 2000.— Vol. 19.— P. 538—541.
11. Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C. et al. Current concepts in the management of Helicobacter pylori infection—The Maastricht III Consensus Report // Gut.— 2007.— Vol. 56, N 7.— P. 772—781.
12. Megraud F. H. pylori antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing // Int. J. Gastroenterol. Hepatol.— 2004.— Vol. 53.— P. 1374—1384.
13. Megraud F., Lehours P. Helicobacter pylori detection and antimicrobial susceptibility testing // Clin. Microbiol. Revies.— 2007.— Vol. 20, N 2.— P. 280—322.
14. Koletzko S., Richey F., Bontems P. et al. Prospective multicenter study on antibiotic resistance of Helicobacter pylori strains obtained from children living in Europe // Gut.— 2006.— Vol. 55 (12).— P. 1711—1716.
15. Lee J., Shin J., Roe I. et al. Impact of claritromycin resistance on eradication of Helicobacter pylori in infected adults // Antimicrob. Agents Chemother.— 2005.— Vol. 4.— P. 1600—1603.
16. Osato M.S., Reddy R., Reddy S.G. et al. Comparison of the E-test and the NSSLs-approved agar dilution method to detect metronidazole and claritromycin resistant Helicobacter pylori // World J. Gastroenterol.— 2010.— Vol. 16 (40).— P. 5118—5121.
17. Zullo A., Perna F., Hassan C. et al. Primary antibiotic resistance in Helicobacter pylori strains isolated in northern and central Italy // Aliment. Pharmacol. Ther.— 2007.— Vol. 25, N 6.— P. 1429—1434.
18. Wang F., Shen S.R., Zhou J.D., Xu C.X. Antibiotic resistance of Helicobacter pylori // Zhong Nan Da Xue Bao Yi Xue Ban.— 2007.— Vol. 32 (3).— P. 447—450.

В.Г. Передерій, Ю.А. Володичева, Ю.Г. Кузенко, І.Г. Костенко

## Бактериологический метод определения чувствительности Helicobacter pylori к антибактериальным препаратам

Неудачное лечение Helicobacter pylori в большинстве случаев обусловлено резистентностью к антихеликобактерным препаратам. Культивирование H. pylori является «золотым стандартом» определения бактерии и единственным методом, позволяющим выделить микроорганизм для последующего изучения чувствительности к антибиотикам. Метод дилуции в агаре одобрен CLSI как метод выбора для определения чувствительности H. pylori к антибактериальным препаратам. В данном исследовании мы изучили и сравнили чувствительность H. pylori к метронидазолу, орнидазолу и кларитромицину. Методом дилуции в агаре резистентность к метронидазолу была выявлена при исследовании 31,9 % штаммов. Перекрестная резистентность H. pylori к метронидазолу и орнидазолу определяется не во всех случаях. Резистентность к кларитромицину была обнаружена при исследовании 10,1 % штаммов H. pylori.

V.G. Peredery, Yu.O. Volodicheva, Yu.G. Kuzenko, I.G. Kostenko

## Bacteriological method: the assessment of the H. pylori susceptibility to antibacterial drugs

The failure of H. pylori eradication is stipulated by the antihelicobacter drug resistance in the most of cases. The H. pylori culture is the «gold standard» for the bacteria detection and is the only method enabling the isolation of the micro-organisms for subsequent assessment of its susceptibility to antibiotics. The agar dilution is approved by the CLSI as the method of choice approved for antimicrobial susceptibility testing of H. pylori. In the present study the authors investigated and compared the susceptibility clinical isolates of H. pylori to metronidazole, ornidazole and clarithromycin. The metronidazole resistance was found in 31.9 % on the strains by agar dilution. The cross resistance of H. pylori to metronidazole and ornidazole was detected not in all the cases. The clarithromycin was found in the tests of 10.1 % of the H. pylori strains.

### Контактна інформація

Володичева Юлія Олександрівна, асистент  
01030, м. Київ, бульв. Т. Шевченка, 17. E-mail: julvolod@ukr.net

Стаття надійшла до редакції 10 лютого 2011 р.