



## ПО МАТЕРИАЛАМ ДИССЕРТАЦИОННЫХ РАБОТ

Г.Ш. ИСАЕВА

УДК 616-022.7.31-07/ 616.366-002

Казанский государственный медицинский университет

## Комплексная диагностика *Helicobacter pylori* инфекции у больных хроническим холециститом

Исаева Гузель Шавхатовна

кандидат медицинских наук, доцент кафедры микробиологии

420140, г. Казань, ул. Айтматова, д. 6, кв. 9, тел. 8-917-936-66-46, e-mail: guisaeva@rambler.ru

Проведено изучение эффективности различных методов обнаружения *H.pylori* в желчи у 50 больных хроническим холециститом. *H.pylori* обнаружены в 50-52% случаев цитологическим методом, ПЦР для детекции *ureC* гена *H.pylori*, проведенная с помощью коммерческого набора, была позитивной в 50% случаев ( $n=38$ ). Ген 16S рДНК рода *Helicobacter* был обнаружен в 50% образцов желчи, при этом ДНК *H.pylori* выявлена в 25% образцов, столько же образцов были положительными в отношении *H.rappini*. Все образцы в отношении генов *cdtB H.pullorum* и *cdtB H.bilis* были негативными. Для диагностики *H.pylori* у больных хроническим холециститом можно рекомендовать комплексный метод, включающий морфологические и молекулярно-генетические исследования.

**Ключевые слова:** *Helicobacter pylori*, диагностика, холецистит.

G.S. ISAYEVA

Kazan State Medical University

## Complex diagnostics of *Helicobacter pylori* infection in patients with chronic cholecystitis

The study of the effectiveness of different methods for detection of *H.pylori* in the bile in 50 patients with chronic cholecystitis was conducted. *H.pylori* were found in 50-52% of the cytological method, PCR for the detection of *ureC* gene *H.pylori*, carried out using a commercial kit was positive in 50% of cases ( $n = 38$ ). Gene 16S rDNA *Helicobacter* genus was detected in 50% of the samples of bile, *H.pylori* DNA was found in 25% of the samples, the same samples were positive for *H.rappini*. All samples for gene *cdtB H.pullorum* and *cdtB H.bilis* were negative. For the diagnosis of *H.pylori* in patients with chronic cholecystitis can be recommended a comprehensive approach that includes morphological and molecular genetic studies.

**Keywords:** *Helicobacter pylori*, diagnosis, cholecystitis.

*Helicobacter pylori* как наиболее изученный и известный представитель рода *Helicobacter* признан возбудителем воспалительных гастродуоденальных заболеваний (гастрита, гастродуоденита, язвенной болезни желудка и 12-перстной кишки). Установление связи между инфицированностью *H.pylori* и раком желудка дало основание Международному агентству по изучению рака отнести его к канцерогенам I группы. Но в научных докладах последних лет все активнее обсуждается вопрос об участии этих бактерий в воспалительных заболеваниях гепатобилиарной системы [8, 18].

Хронический холецистит — одно из наиболее распространенных заболеваний в различных популяциях индустриально развитых стран [7]. Существует несколько теорий возникно-

вения воспалительных заболеваний билиарной системы. Согласно одной из них, основная роль принадлежит инфекции. У здоровых людей микроорганизмы в желчном пузыре обычно отсутствуют. В желчи больных с патологией билиарной системы обнаруживаются патогенные (сальмонеллы, лептоспиры и др.) и условно-патогенные (кишечная палочка, клебсиеллы, протей, энтеробактер, стафилококки, энтерококки и др.) бактерии, вирусы гепатита А, грибы рода Кандида, возбудители протозойных и глистных инвазий. В печати последних лет появились сообщения об обнаружении бактерий рода *Helicobacter* у больных хроническим холециститом в органах гепатобилиарной системы [3, 4, 10, 11, 15]. Расшифровка патогенетических механизмов с участием этих микроорганизмов открывает перспективу

применения противохеликобактерной терапии для лечения и профилактики заболеваний желчного пузыря и печени, а также предотвращения персистенции хеликобактеров в желчных путях и повторной колонизации слизистой оболочки желудка при забросе желчи при желчном рефлюкс-гастрите.

Отсутствие «золотого» стандарта микробиологического подтверждения об обнаружении хеликобактеров в тканях печени, желчного пузыря и желчи может оказывать сдерживающий эффект в исследованиях по изучению этиологической значимости этих бактерий в патогенезе заболеваний гепатобилиарной системы. Кроме того, существует проблема дифференцировки *H. pylori* от других бактерий рода *Helicobacter*, особенно энтерогепатических видов, колонизирующих желчный пузырь животных и человека, в частности *Helicobacter bilis*, *Helicobacter hepaticus*, *Helicobacter pullorum*, *Helicobacter muridarum*, *Helicobacter rappini* и других. Поэтому назрела необходимость в разработке алгоритма комплексного метода диагностики *H. pylori* инфекции у больных хроническим холециститом.

**Цель исследования** — оценка эффективности различных методов обнаружения *H. pylori* в органах гепатобилиарной системы больных хроническим холециститом.

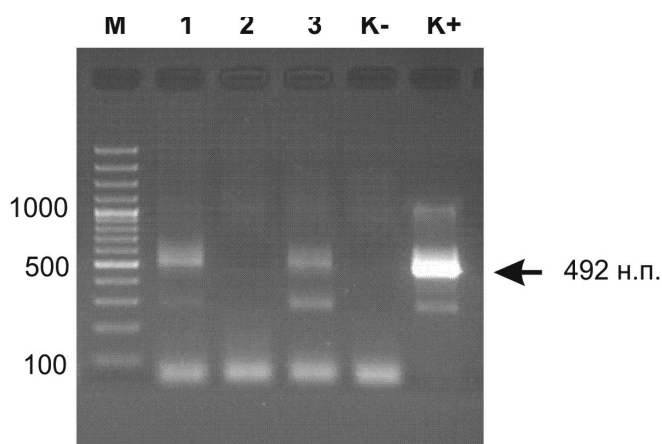
#### Материал и методы исследования

Обследовано 50 больных хроническим некалькулезным холециститом, обратившихся в лечебные учреждения г. Казани (мужчин — 12, женщин — 38). Средний возраст пациентов составил 42,5 года. Всем больным было проведено дуоденальное зондирование с отбором порций желчи, отражающих содержимое желчного пузыря и желчных протоков (В и С). После отбора материала пробирки сразу же отправляли в лабораторию. Пробы желчи были использованы для цитологического и молекулярно-генетического исследований. Из образцов желчи готовили мазки, фиксировали в 96%-ном этиловом спирте и окрашивали катионовым синим О (основным) [2]. Бактерии

*H. pylori* обнаруживали по типичной морфологии — с-образно изогнутые палочки спиралевидной формы. Степень обсеменности в мазках определяли по параметрам, установленным Сиднейской системой.

**Рисунок 1.**

**Детекция ДНК *Helicobacter pylori* в клинических образцах с помощью ПЦР. 1-3 — исследуемые образцы; К<sup>-</sup> — отрицательный контроль; К<sup>+</sup> — положительный контроль; М — маркер**



Выделение ДНК из биопроб (100 мкл желчи) проводили сорбционным способом с использованием набора «Хеликопол» (НПФ «Литех», г. Москва) в соответствии с рекомендациями производителя. Амплификацию специфических фрагментов генома *H. pylori* проводили по методике, предложенной НПФ «Литех» (г. Москва). Определяемыми фрагментами ДНК яв-

**Таблица 1.**

**Праймеры и условия ПЦР для различных ДНК-мишеней**

Название		Ген	Условия ПЦР*	Размер ампликона (п.о.)	Источники
F2-16S-CHPEC R4-16S-CHPEC	Универсальная	16S rRNA	(94°C; 30 сек, 60°C; 30 сек, 72°C; 80 сек)×40	1456	Rocha M. и соавт. (2005) [20]
C97 C98	Род <i>Helicobacter</i>	16S rRNA	(94°C; 30 сек, 54°C; 90 сек 72°C; 60 сек)×35	398	Fox J.G. и соавт. (1998) [9]
HPY S HPY A	<i>Helicobacter pylori</i>	23S rRNA	(94°C; 1 мин, 55°C; 1 мин, 72°C; 1 мин)×40	267	A. Menard и соавт. (2002) [12]
F1-cdtB-pullorum F2-cdtB-pullorum R2-cdtB-pullorum	<i>Helicobacter pullorum</i>	cdtB	94°C; 30 сек, 60°C; 1 мин, 72°C; 20 сек)×40	140 148	Rocha M. и соавт. (2005) [20]
F2-cdtB-bilis R2-cdtB-bilis	<i>Helicobacter bilis</i>	cdtB	(94°C; 30 сек, 60°C; 1 мин, 72°C; 30 сек)×40	151	Rocha M. и соавт. (2005) [20]
F1-ureB-rappini R2-ureB-rappini	<i>Helicobacter rappini</i>	ureB	(94°C; 30 сек, 60°C; 30 сек, 72°C; 10 сек)×40	101	Rocha M. и соавт. (2005) [20]

\* После 4 минут первоначальной денатурации при 94°C каждая реакционная смесь была амплифицирована при указанных условиях. После окончания последнего цикла производили финальный синтез в течение 7 минут при 72°C. Реакцию ПЦР проводили в общем объеме 25 мкл в смеси, содержащей 1×реакционный буфер, 0,2 мМ смеси диоксинуклеозид трифосфатов, 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,5 ед. Taq полимеразы, по 0,5 мкМ каждого праймера и 10 нг ДНК в амплификаторе MJ Mini (BioRad). Выявление амплифицированных фрагментов осуществляли путем их электрофоретического разделения в 2%-ном агарозном геле с добавлением 1%-ного раствора бромистого этидия и визуализации в виде светящихся полос под действием ультрафиолетового свечения. Результаты документировали с помощью видеосистемы для регистрации гелей Gel Imager 2 (Helicon).

лялись гомологичные участки гена *ureC H.pylori*. Кроме того, проводился анализ положительного и отрицательного (деионизированная вода) контрольных образцов для оценки чистоты эксперимента и исключения возможности контаминации. В готовую реакционную смесь вносили по 5 мкл анализируемого образца, тщательно перемешивали и проводили амплификацию по следующей программе: 94°C — 60 сек., 94°C — 30 сек., 60°C — 30 сек., 72°C — 30 сек. в течение 5 циклов; 92°C — 5 сек., 50°C — 10 сек., 72°C — 15 сек. в течение 40 циклов. Выявление амплифицированных фрагментов осуществляли путем их электрофоретического разделения в 2% геле с добавлением 1% раствора бромистого этидия и визуализации в виде светящихся полос, соответствующих 492 п.н.о., под действием ультрафиолетового свечения. Результаты документировали с помощью видеосистемы для регистрации гелей DNA Analyzer (НПФ «ЛИТЕХ», Россия) (рис. 1).

Для детекции ДНК бактерий рода *Helicobacter* использовали молекулярно-генетический метод, состоящий из нескольких этапов. Первый этап включал проведение универсальной ПЦР F2/R4 для амплификации фрагмента 16S рРНК. Следующим этапом было проведение родоспецифической ПЦР С97/С98 с позитивными в реакции F2/R4 образцами ДНК для выявления фрагмента 16S рРНК бактерий рода *Helicobacter*. Затем образцы ДНК, имеющие положительный результат в специфической ПЦР для рода *Helicobacter*, подвергали видоспецифической ПЦР с целью детекции четырех видов хеликобактеров *H.bilis*, *H.pullorum*, *H.pylori* и *H. (Flexispira) rappini*. Праймеры, условия ПЦР и размеры ампликонов представлены в таблице 1.

**Результаты и их обсуждение**

Цитологическое исследование выявило с-образно-изогнутые палочки в 50% образцов пузырной желчи (порция В) и 52,3% образцов протоковой желчи (порция С). При этом в обеих порциях преобладала умеренная обсемененность. Специфической окраски для обнаружения *H.pylori* не существует, хотя некоторые из методов являются более предпочтительными. Наименее подходящей является окраска гематоксилин-эозином из-за слабого контраста между слизью и бактерией, но из-за простоты и дешевизны этот метод нашел широкое применение. Наилучшая визуализация бактерий может быть достигнута при окраске по Вартину-Старри, но эта техника трудна в исполнении, требует приготовления реактивов ex tempore, что ограничивает ее широкое использование. Окраска по Гимзе дает также хороший контраст и лишена минусов окраски по Вартину-Старри, что делает ее популярной в лабораторной практике. В качестве альтернативного метода окраски предложены импрегнация серебром — HPSS (*H.pylori* silver stain), окраска метиленовым синим, смесью карболового фуксина с альциановым голубым. Несмотря на то, что все бактерии рода *Helicobacter* относятся к извитым, морфологически они отличаются друг от друга размерами, количеством завитков, жгутиков, их расположением, наличием или отсутствием периплазматических волокон. Морфологически *H.pylori* отличим от энтерогепатических хеликобактеров, и его диагностика не вызывает затруднений у опытного цитолога, но в сомнительных случаях, особенно при наличии кокковидных форм, можно прибегнуть к иммуноцитохимической окраске с использованием специфических антител против поверхностных протеинов *H.pylori*.

ПЦР — детекция *ureC* гена *H.pylori* с использованием коммерческого набора показала, что ДНК этой бактерии была выявлена из образцов протоковой порции желчи у 19 больных из 38 случаев (50%). При сравнительном изучении различных порций желчи было установлено, что во всех случаях ДНК *H.pylori* была выделена только из порции С, тогда как все образ-

цы порции В, отражающей содержимое желчного пузыря, были *H.pylori* — негативными. На результаты также не оказывало влияние разведения желчи. Разведения желчи 1:10 были сделаны для удаления возможных ингибиторов реакции, но результаты реакции не зависели от разведения: они были одинаковыми как в образцах цельной, так и в разведенной желчи.

При ПЦР-исследовании образцов желчи, отобранных от 12 пациентов, универсальная F2/R4 реакция была положительной в 7 случаях. Последующая реакция С97/С98 выявила ДНК бактерий рода *Helicobacter* в желчи 6 пациентов (50%), из них в одном образце порции В и 5 образцах порции С. Положительные в отношении бактерий рода *Helicobacter* образцы ДНК были последовательно протестированы с помощью видоспецифических праймеров *H.bilis*, *H.pullorum*, *H.pylori* и *H.rappini*. В 3 случаях образцы были позитивными в отношении гена 23S рРНК *H.pylori* и столько же в отношении гена *ureB H.rappini*. Все образцы в отношении генов *cdtB H.pullorum* и *cdtB H.bilis* были негативными.

**Таблица 2.**  
**Сравнение различных методов для диагностики H.pylori-инфекции у больных с заболеваниями билиарной системы**

Метод диагностики	Цитологический	Бактериологический	Молекулярно-генетический
Чувствительность	+++	+	+++
Специфичность	++	+++	+++
Количественная оценка	+++	+++	+
Быстрота	+++	+	++
Доступность	+++	+	+
Необходимость дополнительных исследований	+/- (дополнительно иммуноцитохимический)	+	(дополнительно ПЦР и/или секвенирование)

Примечание:  
+++ — высокая оценка; ++ — средняя оценка;  
+ — низкая оценка

Анализ опубликованных работ по молекулярной детекции ДНК бактерий рода *Helicobacter* в желчном пузыре у больных хроническим холециститом указывает на противоречивость полученных результатов. Chen W. (2003) с соавт. в образцах желчи, полученной при холецистэктомии, ДНК хеликобактеров выявили в 50% случаев, при этом в 56 из 61 положительных проб ДНК соответствовала *H.pylori* [5]. По данным исследования, проведенном в Бразилии в 2002 году, ДНК хеликобактеров

была обнаружена в 31,3% тканей желчного пузыря и 49,9% пузырной желчи [22], а по данным более позднего исследования у бразильских больных хроническим холециститом ДНК бактерий рода *Helicobacter* была выявлена в 61,8% случаев в образцах пузырной желчи [15]. В исследовании ДНК *H. pylori* была выделена из желчи у 51,5% больных калькулезным холециститом (Италия), при этом была отмечена корреляция между присутствием *H. pylori* в желчи, колонизацией в слизистой оболочке желудка и присутствием антигена в фекалиях [17]. В исследовании тканей желчного пузыря, полученных от 68 пациентов при холецистэктомии (Турция), ДНК *H. pylori* была обнаружена в 15 образцах (22%), но бактериологически эти бактерии не выделены [24]. В то же время в более ранних исследованиях, проведенных в Германии [21] и Мексике [13], сообщается о неудачных попытках обнаружения хеликобактерной ДНК в желчи и слизистой оболочке желчного пузыря при заболеваниях билиарного тракта. В южно-корейском исследовании с участием 43 пациентов ни в одном случае с помощью ПЦР не удалось выявить ДНК *H. pylori* ни в желчи, ни в тканях желчного пузыря [16]. Невысокий процент положительных проб был получен другими южно-корейскими исследователями: ДНК *H. pylori* была обнаружена в 6 из 48 образцов желчи [11]. В исследовании Kaşapın P. (2010) только у 7 из 100 больных хроническим и острым холециститом была обнаружена ДНК *Helicobacter*, при этом в шести случаях секвенирование доказало принадлежность ДНК *H. pullorum* и только в одном случае — *H. pylori* [10]. Такой разброс результатов молекулярно-генетических исследований можно объяснить применением различных методик по экстракции ДНК из образцов, обладающих различной эффективностью, и отсутствием единых методологических подходов на всех этапах молекулярно-генетического анализа. В нашем исследовании при использовании одинаковой методики выделения ДНК из образцов мы получили результаты, указывающие на присутствие генов хеликобактеров в 50% случаев при применении различных методик детекции. Но при этом ПЦР, проведенная с помощью коммерческого набора, была позитивной в отношении *H. pylori* в 50% случаев, а по результатам многоступенчатой ПЦР детекции *H. pylori* и энтерогепатических хеликобактеров только половина выделенной ДНК принадлежала *H. pylori*, что составило 25%, в остальных случаях — энтерогепатическим хеликобактерам, в частности *H. rappini*. Молекулярная биология является бесценным инструментом для идентификации микроорганизмов. Полимеразно-цепная реакция и/или секвенирование может стать «золотым» стандартом детекции бактерий рода *Helicobacter*. Анализ опубликованных докладов и результатов, полученных в данном исследовании, указывает на необходимость стандартизации методов генетической детекции бактерий рода *Helicobacter* и разработки коммерческих наборов, доступных для практических лабораторий.

Сообщения об успешном выделении бактерий рода *Helicobacter* из органов гепатобилиарной системы единичны [1, 6, 14, 23]. Трудности бактериологического метода исследования могут быть обусловлены различными факторами. Возможно, что исследуемый материал содержит ингибиторы роста хеликобактеров (желчные кислоты, ферменты и т.д.), либо это связано с недостатками технического исполнения (длительная транспортировка, замораживание образцов и т.д.), а также с особенностями микроорганизмов (некоторые виды энтерогепатических хеликобактеров относятся к некультивируемым, и получение культуры возбудителя возможно только биологическим методом). Методика идентификации чистой культуры *H. pylori*, выделенной из органов гепатобилиарной системы, отличается от стандарта, принятого для штаммов, выделенных из слизистой оболочки желудка. Эта особенность

заключается в необходимости генетического подтверждения принадлежности полученного изолята к данному виду, так как в желчном пузыре могут обитать другие представители бактерий рода *Helicobacter*, обладающие сходной с *H. pylori* биохимической активностью. К таковым, в частности, относятся *H. bilis*, *H. hepaticus*, *H. trogontum*, *H. muridarum*, хотя остальные представители энтерогепатических хеликобактеров являются уреазоотрицательными. Так, в исследовании Pradhan S.B. (2009) в 76,7% образцов слизистой оболочки желчного пузыря была получена культура грамотрицательных оксидаза-, каталаза-, уреазы-положительных бактерий. Гистологическое исследование показало их принадлежность к *H. hepaticus* [19]. Стандартная биохимическая идентификация *H. pylori* по трем ферментам (тест на каталазу, оксидазу и уреазу) недостаточна для подтверждения видовой принадлежности штаммов, выделенных из биологического материала внежелудочной локализации. Разработка коммерческих мультимикротестов, включающий более широкий набор определяемых ферментов, может значительно облегчить биохимическую идентификацию бактерий этого рода.

Для определения эффективности различных методов диагностики *H. pylori*-инфекции у больных с заболеваниями гепатобилиарной системы, по результатам собственных исследований и опубликованных работ, была проведена сравнительная оценка микроскопического, бактериологического, молекулярно-генетического методов по следующим критериям: специфичность, чувствительность, возможность количественной оценки обсемененности *H. pylori*, быстрота получения результатов, доступность и необходимость проведения дополнительных исследований (таблица 2).

Таким образом, ни один из существующих методов диагностики *H. pylori* у больных гепатобилиарными заболеваниями не является универсальным. Пределы возможностей ограничены не только их чувствительностью и специфичностью, но и зависят от множества факторов: особенностей микроорганизма, его количественного содержания, неравномерности распределения бактерий в слизистой оболочке и тканях и других факторов. Для диагностики *H. pylori* у больных с заболеваниями гепатобилиарной системы можно рекомендовать комплексный метод, включающий морфологический и молекулярно-генетический методы исследования.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Исаева Г.Ш., Абузарова Э.Р., Валеева Ю.В. и др. *Helicobacter pylori* у больных с заболеваниями гепатобилиарной системы // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. — 2009. — № 2. — С. 96-101.
2. Исаева Г.Ш., Ефимова Н.Г., Хайрутдинова Г.Н. Окраска катионом синим О для цитологического выявления *Helicobacter pylori* // Клиническая лабораторная диагностика. — 2009. — № 5. — С. 19-20, 37.
3. Chen D.F., Hu L., Yi P., Fang D.C. et al. *H. pylori* exist in the gallbladder mucosa of patients with chronic cholecystitis. // W. J. Gastroenterol. — 2007. — Vol. 13, № 10. — P. 1608-1611.
4. Chen D.F., Hu L., Yi P., Liu W.W., Fang D.-Ch., Cao H. *H. pylori* are associated with chronic cholecystitis // W. J. Gastroenterol. — 2007. — Vol. 13, № 7. — P. 1119-1122.
5. Chen W., Li D., Cannan R.J., Stubbs R.S. Common presence of *Helicobacter* DNA in the gallbladder of patients with gallstone diseases and controls // Dig. Liver Dis. — 2003. — Vol. 35. — P. 237-243.

Полный список литературы на сайте [www.mfvt.ru](http://www.mfvt.ru), [www.pmarchive.ru](http://www.pmarchive.ru)