

8. Han H.J., Choi S.B., Kim W.B., Choi S.Y. Single-incision multiport laparoscopic cholecystectomy: things to overcome // Arch. Surg. – 2011. – Vol. 146, Issue 1. – P. 68-73.
9. Kaushik R. Bleeding complications in laparoscopic cholecystectomy: Incidence, mechanisms, prevention and management // J. Minim. Access. Surg. – 2010. – Vol. 6, Issue 3. – P. 59-65.

УДК 616.33-002.44+615.33

АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ *H. PYLORI*: РЕЗУЛЬТАТЫ МИКРОБИОЛОГИЧЕСКОГО РЕГИОНАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Н. Н. Дехнич¹, Е. А. Костякова¹, А. А. Пунин¹, А. В. Алимов², Н. В. Иванчик³, Р. С. Козлов³

¹ГОУ ВПО СГМА Росздрава, кафедра факультетской терапии

²МЛПУ клиническая больница № 1 г. Смоленска

³ГОУ ВПО СГМА Росздрава, НИИ антимикробной химиотерапии

Резюме

В исследование было включено 210 взрослых пациентов с *H. pylori*-ассоциированными заболеваниями с положительным быстрым уреазным тестом в 2009–2010 гг. в г. Смоленске. *H. pylori* был выделен у 64% (n=135) пациентов. Предшествующий прием антибактериальных лекарственных средств снижал частоту выделения *H. pylori*. Определялась чувствительность *H. pylori* к амоксициллину, эритромицину, левофлоксацину, ципрофлоксацину, тетрациклину и метронидазолу методом разведения в агаре. Из 133 штаммов *H. pylori* к одному антимикробному препарату были резистентны 24 изолята (18%), к двум и более препаратам – 4 штамма (3%). Частота резистентности *H. pylori* к макролидам составила 7,6% (n=10), к метронидазолу – 3,8% (n=5). Не выявлено резистентных штаммов *H. pylori* к амоксициллину и тетрациклину. Уровень резистентности *H. pylori* к ципрофлоксацину составил 12,8% (n=17), к левофлоксацину – 8,3% (n=11).

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, антибиотикорезистентность, макролиды, метронидазол, амоксициллин.

H. PYLORI ANTIBIOTIC RESISTANCE: RESULTS OF MICROBIOLOGICAL LOCAL STUDY

N. N. Dekhnich, T. A. Kostyakova, A. A. Punin, A. V. Alimov, N. V. Ivanchik, R. S. Kozlov

Summary

210 adult patients with *H. pylori*-associated diseases with quick positive urease test were investigated. *H. pylori* was secured in 64% patients. *H. pylori* sensitivity to different antibiotics by the dilution in agar was determined. It was found resistance of 24 *H. pylori* isolates to one antibiotic, 4 strains – to two and more drugs. Resistance rate to macrolides was 7,6%, to metronidazol – 3,8%. The resistant strains to amoxycilline and tetracycline were not revealed. Resistance rate to ciprofloxacin was 12,8%, to levofloxacin – 8,3%.

Keywords: *Helicobacter pylori*, antibiotics resistance, macrolides, metronidazol, amoxycilline.

Знаете ли вы уровень антибиотикорезистентности *H. pylori* в своем регионе? Скорее нет, так как микробиологическое выделение *H. pylori* с определением чувствительности к антимикробным препаратам на сегодняшний день является малодоступным методом диагностики в широкой клинической практике, что связано с особенностями возбудителя. Встречаемость устойчивости *H. pylori* к антибактериальным лекарственным средствам, используемым в лечении *H. pylori*-ассоциированных заболеваний, имеет решающее значение в выборе терапии. Необходимость коррекции лечения на основе локальной картины антибиотикорезистентности подчеркивается в Маастрихтском консенсусе III, который является основополагающим международным руководством по диагностике и лечению *H. pylori*-инфекции. Рекомендуются терапия первой линии – ИПП + кларитромицин + амоксициллин или метронидазол, если первичная резистентность к кларитромицину в регионе менее 15–20%, к метронидазолу менее 40% [7].

В настоящее время установлена возможность развития резистентности *H. pylori* ко всем группам антибактериальных препаратов, что снижает эффективность терапии. Так, при лечении язвенной болезни, вызванной чувствительными к кларитромицину штаммами *H. pylori*, эрадикацию наблюдали у 80–90% пациентов, а при лечении инфекций, вызванных устойчивыми штаммами, частота эрадикации снижалась до 20–30% [6]. Частота распространения среди населения устойчивых к макролидам штаммов *H. pylori* варьирует в различных регионах в достаточно широких пределах. Наибольшую частоту наблюдают в развивающихся странах – 20–40%. В странах Европы этот показатель в среднем составлял 9,9% со значительными различиями между Северной Европой

(9,3%) и Южной Европой (18%) [3]. Самый низкий уровень резистентности *H. pylori* к макролидам отмечен в Великобритании (1,3%), а самый высокий в Италии (27,2%). По данным мониторинга антибиотикорезистентности, в США с 1998 по 2002 г. отмечался рост резистентности *H. pylori* к кларитромицину до 10–14% [10].

К сожалению, данные по антибиотикорезистентности *H. pylori* к макролидам в России ограничены. Так, по данным Л. В. Кудрявцевой [2], в 1996 г. в г. Москве резистентных штаммов *H. pylori* к кларитромицину не было выявлено. В 1999 г. уровень резистентности *H. pylori* к кларитромицину составил 17,1%, в 2000 г. – 16,6%, в 2001 г. – 13,8%. В Казани в 2007 г. резистентные штаммы *H. pylori* к кларитромицину определялись в 15% случаев [1]. Небольшое количество протестированных штаммов *H. pylori* и ограниченная география исследования не позволяют сделать однозначные выводы о состоянии резистентности *H. pylori* к макролидам в России.

Многоцентровые исследования Европейской группы по изучению *H. pylori* показали, что средний уровень резистентности *H. pylori* к нитроимидазолам составлял 33,1%, с незначительными колебаниями на Севере и на Юге. Самый низкий уровень резистентности *H. pylori* к нитроимидазолам был отмечен в Бельгии – 18,9%, а самый высокий в Финляндии – 61,6% [4]. В Италии устойчивых к нитроимидазолам штаммов *H. pylori* выявлено 14,9%, в то время как в Бразилии – более 70%, а в Японии 9–12% [9]. В США частота встречаемости резистентных штаммов *H. pylori* к метронидазолу колеблется от 20 до 40% [8]. В Москве на протяжении 1996–2001 гг. отмечалось увеличение уровня резистентности *H. pylori* к

метронидазолу от 5,9 до 55,5% [2], что значительно снижало эффективность эрадикационных схем. Кроме того, частое потребление метронидазола в популяции повышает риск развития резистентных штаммов *H. pylori*. При этом уровень вторичной резистентности *H. pylori* к метронидазолу достигает 75% [5].

В качестве альтернативного препарата, при высоком уровне резистентности *H. pylori* к макролидам и нитроимидазолам, Европейской группой по изучению *H. pylori* рекомендуется использование схем на основе левофлоксацина. Однако имеются сообщения, указывающие на рост резистентности *H. pylori* к данному препарату в последние годы за счет большого потребления фторхинолонов. Так, уже в 1999 г. в Португалии зарегистрирован уровень *H. pylori* к левофлоксацину – 20%. Уровень вторичной резистентности *H. pylori* к левофлоксацину в Германии составил 9% [5].

Устойчивость *H. pylori* к амоксициллину на настоящий момент относительно низкая (<1%). При проведении многоцентрового исследования антибиотикорезистентности *H. pylori* в Европе штаммы, устойчивые к данному препарату, были зарегистрированы только в Италии, Германии и Великобритании с частотой 8,2%, 4,0% и 1,2% соответственно [4].

Цель исследования: создание рекомендаций по эмпирическому лечению *H. pylori*-ассоциированных заболеваний на основе локальной картины антибиотикорезистентности.

Материалы и методы

В настоящее проспективное исследование включали амбулаторных и госпитализированных пациентов обоего пола с *H. pylori*-ассоциированными заболеваниями с положительным быстрым уреазным тестом при проведении эзофагогастродуоденоскопии.

В ходе исследования каждый пациент осматривался врачом, собирались анамнестические данные, позволяющие определить нозологическую форму, характеристику предшествующей антибиотикотерапии.

Материалом для исследования явились гастробиоптаты пациентов с положительным быстрым уреазным тестом с использованием ХЕЛПИЛ-теста (Ассоциация медицины и аналитики, Санкт-Петербург). В ходе эндоскопического исследования осуществляли забор двух биопсийных образцов из антрального отдела желудка и двух из тела желудка для бактериологического исследования.

Четыре биоптата от каждого пациента немедленно помещались в транспортную среду. В случае если время от взятия материала до доставки в микробиологическую лабораторию не превышало 6 ч, использовался фосфатный буфер (Sigma, США). Если доставки образцов осуществлялась в течение 6–48 ч, в качестве транспортной среды использовался Portagerm pylori (BioMérieux, Франция).

Перед посевом биопсийный материал гомогенизировался в пробирке Эппендорфа с 0,5 мл стерильного физиологического раствора при помощи стерильной микробиологической петли в течение 1 мин. Затем по две капли гомогенизированного раствора помещали на поверхности чашек с питательными средами: селективную (Pylori agar, BioMérieux, Франция) и неселективную (кровяной агар: основа агар Мюллера Хинтона, BBL, США + 5% бараньей крови).

Чашки с посевами немедленно помещались в анаэробный контейнер, где с помощью газогенерирующих пакетов «GENbox microaer», BioMérieux, Франция создавалась микроаэрофильная атмосфера (O₂ 11%, CO₂ 9%, N₂ 80%). Посевы инкубировались в термостате при температуре +37°C и влажности 95%. Учет результатов посева проводился через 3 суток. В случае отсутствия признаков роста инкубация продолжалась до 10 суток. На 3–5-е сутки на кровяном агаре и Pylori агаре *H. pylori* формировал мелкие, круглые, гладкие, прозрачные колонии диаметром 1–3 мм.

При получении роста колоний, по морфологии сходных с *H. pylori*, проводилась их идентификация, которая включала в себя окраску мазка по Граму и биохимические тесты: уреазный, каталазный и оксидазный.

Хранение штаммов осуществляется в пробирках с триптиказо-соевым бульоном (BioMérieux, Франция) с добавлением 30% стерильного глицерина (Sigma, США) при температуре -70°C.

Определение чувствительности

В соответствии с рекомендациями Института по клиническому и лабораторным стандартам США (CLSI) исследование чувствительности *H. pylori* с определением минимальной подавляющей концентрации (МПК) проводили методом разведения в катион-сбалансированном агаре Мюллера-Хинтона (BBL, США) с добавлением 5% бараньей крови.

Для приготовления инокулюма использовали двухдневную культуру *H. pylori*, разведенную 3–5 мл стерильного физиологического раствора до достижения плотности, эквивалентной стандарту мутности 2 по McFarland (DEN-1 McFarland Densitometer, BIOSAN, Латвия) с непосредственной инокуляцией чашек с последовательными разведениями антимикробных препаратов с помощью Multipoint Inoculator (Mast Diagnostics, Великобритания). Инкубация чашек проводилась 72 часа в микроаэрофильных условиях (GEN box microaer) при температуре +37°C. Для чашек с метронидазолом проводилась предварительная инкубация в течение 24 ч в анаэробных условиях.

Определялась чувствительность *H. pylori* к амоксициллину, эритромицину, левофлоксацину, ципрофлоксацину, тетрациклину и метронидазолу. При тестировании использовали двойные серийные разведения химически чистых субстанций антибиотиков. Для контроля адекватности разведений АМП был использован *S. pneumoniae* ATCC 49619.

Данные были введены путем двойного ввода в электронную базу данных на основе Microsoft SQL Server 2005 и Microsoft Access 2003. Статистический анализ проводился в системе статистического анализа SAS (программный пакет SAS Institute, США, версия 8.02 для Windows 98).

Результаты

Общие и демографические данные

В исследование было включено 210 пациентов, среди которых 77 мужчин (36,7%) и 133 женщины (63,3%). Средний возраст пациентов составил 49±16,03 лет. Соотношение мужчины/женщины 1:1,7. Средний возраст мужчин 47±16,28 лет. Средний возраст женщин 51±16,20 лет. Доля амбулаторных пациентов составила 63,8% (n=134), стационарных больных 36,2% (n=76).

Характеристика нозологических форм

В исследование были включены пациенты с различными заболеваниями, ассоциированными с *H. pylori*. Наиболее частой нозологической формой явился хронический поверхностный гастрит – 48,5% (n=102). Диагноз эрозивный гастрит был установлен у 20,9% пациентов (n=44), язвенная болезнь 12-перстной кишки у 15,2% (n=32), атрофический гастрит у 10% (n=21), гиперпластический гастрит у 3,8% (n=8) и язвенная болезнь желудка у 1,4% (n=3) пациентов.

Частота выделения *H. pylori*

Частота выделения *H. pylori* составила 64% (n=135). При этом рост *H. pylori* выявлялся у 68,8% (n=22) пациентов с язвенной болезнью 12-перстной кишки, у 66% (n=29) больных с эрозивным гастритом, у 65,6% (n=67) пациентов с хроническим поверхностным гастритом, у 50% (n=4) с гиперпластическим гастритом, у 47,6% (n=10) с атрофическим гастритом. *H. pylori* был выделен у всех пациентов с язвенной болезнью желудка (n=3).

Предшествующий прием антибактериальных препаратов

Для анализа предшествующей терапии антибактериальными препаратами, включая антигеликобактерную терапию, пациенты были разделены на 2 группы.

В 1-ю группу были отнесены пациенты, не принимавшие антимикробные лекарственные средства ($n=145$), что составило 69% от всех исследуемых. Среди больных, не принимающих

антибиотики, рост *H. pylori* отмечен в 74,5% ($n=108$) случаев, что статистически значимо чаще ($p<0,0001$), чем во 2-й группе.

Во 2-ю группу были включены пациенты, принимавшие антимикробные лекарственные средства ($n=65$), что составило 31% от всех исследуемых. При этом *H. pylori* был выделен во 2-й группе лишь у 41,5% ($n=27$) больных (рис. 1).

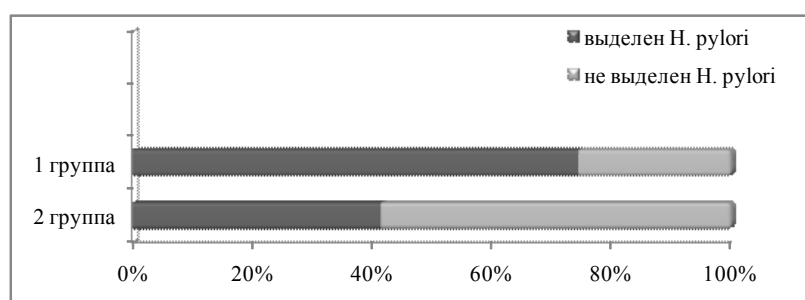


Рис. 1. Частота выделения *H. pylori* в 1-й и 2-й группах

Среди антибактериальных препаратов, включающих антигеликобактерные режимы терапии, пациентами 2-й группы при выделении *H. pylori* использовались: ципрофлоксацин в 37% ($n=10$) случаев, амоксициллин в 26% ($n=7$), макролиды в 11% ($n=3$), метронидазол в 7,4% ($n=2$), гентамицин в 3,7% ($n=1$), цефазолин в 3,7% ($n=1$); ИПП + кларитромицин + метронидазол в 3,7% ($n=1$) случаев, неуточненная эрадикация была отмечена в 7,4% ($n=2$). В случае отсутствия роста *H. pylori* у пациентов 2-й группы предшествующая антимикробная терапия была отмечена у 38 пациентов (58,5%). Среди антимикробных лекарственных средств, используемых пациентами 2-й группы при отсутствии роста *H. pylori*, указаны: амоксициллин 23,6% ($n=9$), цефалоспорины 23,6% ($n=9$), азитромицин 10,6% ($n=4$), ципрофлоксацин 5,3% ($n=2$), метронидазол 5,3% ($n=2$), линкомицин 2,6% ($n=1$). Среди ан-

тигеликобактерных схем были отмечены: ИПП + кларитромицин + амоксициллин 10,6% ($n=4$), ИПП + метронидазол + амоксициллин 5,3% ($n=2$), ИПП + кларитромицин + метронидазол 5,3% ($n=2$), в 7,8% ($n=3$) случаях пациенты не могли указать названия всех препаратов эрадикационной схемы.

Результаты определения чувствительности *H. pylori* к антимикробным препаратам

Общее число тестируемых штаммов *H. pylori* для определения чувствительности к антимикробным препаратам составило 133 (2 штамма *H. pylori* погибли при хранении).

В качестве критериев оценки чувствительности *H. pylori* использовались рекомендации CLSI, 2010 г., Британского общества по антимикробной химиотерапии (BSAC, 2009 г.) и Французского общества микробиологов (SFM, 2007 г.) в зависимости от препарата (табл. 1).

Таблица 1. Критерии оценки чувствительности *H. pylori* к антимикробным препаратам

АМП	Критерии оценки, мг/л		
	Ч	УР	Р
Амоксициллин (BSAC)	≤ 1	-	>1
Эритромицин (SFM)	≤ 1	2	>4
Метронидазол (BSAC)	≤ 4	-	>4
Тетрациклин (BSAC)	≤ 2	-	>2
Левифлоксацин (SFM)	≤ 1	-	>1
Ципрофлоксацин (SFM)	≤ 1	-	>1

Из 133 штаммов *H. pylori* 24 (18%) были резистентны к одному антимикробному препарату (или одной группе антибиотиков), 4 штамма (3%) — к двум и более препаратам разных групп антимикробных лекарственных средств. Общее число пациентов, имеющих резистентные штаммы хотя бы к одному препарату, составило 28 (21%) от общего числа выделенных штаммов.

Резистентность *H. pylori* к амоксициллину

Не выявлено резистентных штаммов *H. pylori* к амоксициллину (табл. 2). МПК₅₀ и МПК₉₀ составили 0,03 мг/мл и 0,125 мг/мл соответственно.

Резистентность *H. pylori* к метронидазолу

Отмечена низкая частота резистентности *H. pylori* к метронидазолу 3,8% ($n=5$), МПК₉₀=0,25 мг/мл.

Резистентность *H. pylori* к тетрациклину

Не выявлено резистентных штаммов *H. pylori* к тетрациклину. МПК₅₀ и МПК₉₀ составили 0,125 мг/мл и 0,25 мг/мл соответственно.

Таким образом, выявлена высокая активность амоксицилина (100%), тетрациклина (100%) и метронидазола (96,2%) в отношении исследованных штаммов *H. pylori*.

Таблица 2. Чувствительность *H. pylori* к антимикробным препаратам

АМП	МПК ₅₀ , мг/л	МПК ₉₀ , мг/л	Ч		УР		Р	
			n	%	n	%	n	%
Эритромицин	0,125	0,5	123	92,4%	-	-	10	7,6%
Метронидазол	0,06	0,25	128	96,2%	-	-	5	3,8%
Ципрофлоксацин	0,5	4	116	87,2%	-	-	17	12,8%
Левифлоксацин	0,5	1	122	91,7%	-	-	11	8,3%
Амоксициллин	0,03	0,125	133	100%	-	-	-	-
Тетрациклин	0,125	0,25	133	100%	-	-	-	-

Резистентность H. pylori к макролидам

Несмотря на то, что эритромицин не применяется в клинической практике для лечения *H. pylori*-инфекции, он может использоваться в качестве маркера устойчивости *H. pylori* ко всем макролидам. Согласно полученным данным, частота резистентности *H. pylori* к эритромицину составила 7,6% (n=10) (МПК₉₀=0,5 мг/мл), что указывает на относительно низкий уровень устойчивости *H. pylori* к макролидам (табл. 2).

Резистентность H. pylori к фторхинолонам

Зарегистрирован относительно высокий уровень резистентности *H. pylori* к ципрофлоксацину – 12,8% (n=17), (МПК₉₀=4 мг/мл). Частота резистентности *H. pylori* к левофлоксацину составила 8,3% (n=11) при МПК₉₀=1 мг/мл.

Относительно высокий уровень резистентности к фторхинолонам, по-видимому, связан с частым использованием данных препаратов в терапии различных инфекций.

Предшествующая антибактериальная терапия у пациентов, от которых были выделены резистентные штаммы H. pylori

Среди 28 пациентов, от которых были выделены резистентные штаммы *H. pylori*, предшествующую антибактериальную терапию отметили 28,6% больных (n=8). Среди антимикробных лекарственных средств использовались: ципрофлоксацин 25% (n=2), цефазолин 25% (n=2), амоксициллин 12,5% (n=1), метронидазол 12,5% (n=1), эрадикация *H. pylori* проводилась у 2 пациентов (25%). Наиболее часто у этих пациентов отмечалась резистентность *H. pylori* к фторхинолонам – 62,5% (n=5), реже к макролидам – 25% (n=2), а также к макролидам в сочетании с метронидазолом – 12,5% (n=1). Причем во всех случаях выделения резистентных к макролидам штаммов *H. pylori* пациенты отмечали предшествующую неутонченную эрадикационную терапию.

Предшествующая антибактериальная терапия у пациентов, от которых были выделены чувствительные к антибактериальным препаратам штаммы H. pylori

Среди 105 пациентов, имеющих чувствительные штаммы *H. pylori* к антибактериальным лекарственным средствам, предшествующую антибактериальную терапию отметили 16% больных (n=17). Среди антимикробных лекарственных средств использовались: ципрофлоксацин 41,1% (n=7), амоксициллин 29,4% (n=5), азитромицин 11,8% (n=2), метронидазол 5,9% (n=1), гентамицин 5,9% (n=1) и олететрин 5,9% (n=1).

Учитывая небольшие группы сравнения, достоверно сказать, что предшествующий прием антибактериальных препаратов влияет на частоту формирования резистентных штаммов *H. pylori*, по результатам данного исследования, не представляется возможным.

Выводы

1. На основе локальных данных антибиотикорезистентности *H. pylori* обосновано использование эрадикационных схем для лечения *H. pylori*-ассоциированных заболеваний:

ИПП + кларитромицин + амоксициллин

ИПП + кларитромицин + метронидазол

ИПП + висмута субсалицилат + тетрациклин + метронидазол

ИПП + амоксициллин + метронидазол

ИПП + тетрациклин + метронидазол

2. Целесообразность использования хинолонов в качестве резервной терапии *H. pylori*-ассоциированных заболеваний является сомнительной в связи с относительно высоким уровнем резистентности *H. pylori* к данной группе антимикробных лекарственных средств.

3. Предшествующий прием антибактериальных лекарственных средств достоверно снижает частоту выделения *H. pylori*.

ЛИТЕРАТУРА

- Консолар М. Новые подходы к диагностике и элиминации *Helicobacter pylori* при язвенной патологии желудочно-кишечного тракта. Автореф. дис. ... канд. биол. наук. - Казань, 2007.
- Кудрявцева Л.В. Состояние антибиотикорезистентности *H. pylori* в России // Экспер. и клин. гастроэнтерол. – 2003. – № 3. – С. 4–5.
- Boyanova L., Mentis A., Gubina M. et al. The status of antimicrobial resistance of *Helicobacter pylori* in Eastern Europe // Clin. Microbiol. Infect. – 2002. – Vol. 8. – P. 388-396.
- Glupczynsky Y., Megraud F., Lopez Brea M., Andersen L.P. European Multicentre survey of in vitro antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori* // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2001. – Vol. 20. – P. 820-823.
- Heep M., Kist M., Strobel S., Beck D., Lehn N. Secondary resistance among 554 isolates of *Helicobacter pylori* after failure of therapy // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2000. – Vol. 19. – P. 538-541.
- MacMahon B.J., Hennessy T.N., Bensler J.M. et al. The Relationship among Previous Antimicrobial Use, Antimicrobial Resistance, and Treatment Outcomes for *Helicobacter pylori* Infections // Ann. Intern. Med. - 2003. – Vol. 139. – P. 463-469.
- Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C. Guidelines for management of *Helicobacter pylori* infection // European gastroenterology review, 2005. – P. 59-62.
- Osato M.S., Reddy R., Reddy S.G., Penland R.L. et al. Pattern of primary resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole or claritromycin in the United States // Arch. Int. Med. – 2001. – Vol. 161. – P. 1217-1220.
- Perez Aldana L., Kato M., Nakagawa S., Kawarasaki M. et al. The relationship between consumption of antimicrobial agents and the prevalence of primary *Helicobacter pylori* resistance // Helicobacter. – 2002. – Vol. 7. – P. 306-309.
- William M., Jeremy S., Pruckler J., Sond Q. et al. Antimicrobial resistance incidence and risk factors among *Helicobacter pylori* – infected persons // United States. Emerg. Infect. Dis. – 2004. – Vol. 10. – P. 1088-1099.