

ГАСТРОЭНТЕРОЛОГИЯ

УДК 616.3-078.33-018

ГИСТОЛОГИЧЕСКАЯ И МИКРОБИОЛОГИЧЕСКАЯ ДИАГНОСТИКА *H. PYLORI*-ИНФЕКЦИИ: РЕЗУЛЬТАТЫ РЕГИОНАЛЬНОГО ИССЛЕДОВАНИЯ

Н. Н. Дехнич¹, Е. А. Костякова¹, А. В. Алимов², Н. В. Иванчик³¹Кафедра факультетской терапии, ГОУ ВПО Смоленская государственная медицинская академия²МЛПУ клиническая больница № 1 г. Смоленска³НИИ антимикробной химиотерапии, ГОУ ВПО Смоленская государственная медицинская академия

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. Гистологическое заключение оказалось информативным у 179 участников исследования. Из них инфицирование *H. pylori* было подтверждено гистологическим методом при окраске биоптата по Романовскому-Гимзе у 124 пациентов (69,3%), микробиологическим методом *H. pylori* был обнаружен у 116 пациентов (64,8%). Гистологическое и микробиологическое подтверждение *H. pylori*-инфекции получили 83 пациента (46,4%). Из 124 пациентов, у которых *H. pylori* обнаружен гистологическим методом, отсутствие роста *H. pylori* при посеве биопсийного материала отмечен у 33% пациентов (n=41). Из 116 пациентов, у которых *H. pylori* обнаружен микробиологическим методом, отрицательный гистологический результат зарегистрирован у 28,4% пациентов (n=33).

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, гистологический метод, микробиологический метод.

HISTOLOGICAL AND MICROBIOLOGICAL DIAGNOSTICS OF *H. PYLORI*-INFECTION: RESULTS OF LOCAL STUDY

N. N. Dekhnich, T. A. Kostyakova, A. V. Alimov, N. V. Ivanchik

Summary

Overall 210 adult patients with *H. pylori*-associated diseases with positive results of rapid urease test were included in the study in 2009–2010 in Smolensk. Histological finding appeared to be informative in 179 enrolled patients. Among them detection of *H. pylori* – infection was revealed by means of histological method in 124 patients (69,3%), of microbiological method – in 116 patients (64,8%). Histological and microbiological confirmation of *H. pylori* – infection was received in 83 patients (46,4%). In 124 patients with histological confirmation lack of *H. pylori*-growth by plating of biopsy specimens was registered in 33% patients (n=41). In 116 patients with microbiological confirmation negative histological finding was registered in 28,4% patients (n=33).

Keywords: *Helicobacter pylori*, histological method, microbiological method.

В настоящее время разработано и используется большое количество методов диагностики, позволяющих выявлять и идентифицировать *H. pylori*. Развитие и усовершенствование этих методов помогло в получении ценной информации об эпидемиологии хеликобактериоза, сыграло большую роль в понимании патогенеза этой инфекции. Это позволило разработать наиболее эффективные схемы антигеликобактерной терапии и мероприятия, направленные на профилактику *H. pylori*-инфекции [1].

Тем не менее ни один из существующих методов инвазивной диагностики *H. pylori*-инфекции не универсален, каждый имеет свои преимущества и недостатки. Пределы возможностей этих методов зависят от многих причин, в том числе от особенностей забора, транспортировки материала, выделения возбудителя и т. д. [4].

Во время проведения многочисленных сравнительных исследований установлено, что результаты различных методов диагностики *H. pylori* не всегда идентичны. Поэтому целью данного исследования было выявить расхождение результатов морфологического и бактериологического методов диагностики *H. pylori* и определить его возможные причины.

Материалы и методы

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

Материалом для исследования явились гастробиоптаты пациентов с положительным быстрым уреазным тестом с использованием ХЕЛПИЛ-теста. В ходе эндоскопического исследования осуществляли забор двух биопсийных образцов из антрального отдела желудка и двух из тела желудка для бак-

териологического исследования, а также одного биопсийного материала из антрального отдела желудка для гистологического исследования. Забор биопсийного материала производился из мест с максимально выраженной гиперемией и отеком.

При гистологическом исследовании проводилась микроскопия парафиновых срезов, окрашенных по Романовскому-Гимзе. *H. pylori* определялись в виде мелких слегка извитых палочек, находящихся в просвете желудка в непосредственной близости от собственной пластинки слизистой оболочки желудка и на поверхности эпителиальных клеток.

Оценка биопсийных образцов проводилась в соответствии с критериями, предложенными Л. И. Аруином, согласно которым выделяют три степени обсемененности *H. pylori*: слабая (+) – до 20 микробных тел в поле зрения; средняя (++) – до 50 микробных тел в поле зрения; высокая (+++) – более 50 микробных тел в поле зрения [1].

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 доставка 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 Хинтон, BBL, США + 5% бараньей крови).

Чашки с посевами немедленно помещались в анаэробстат-контейнер, где с помощью газогенерирующих пакетов «GENbox microaer», BioMerieux, 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 продлялась 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.

Уреазный тест проводится в пробирках типа эппендорф, куда вносится 2% раствор мочевины по Кристенсену с феноловым-красным, а затем добавляется чистая культура *H. pylori*. Уреазный тест считается положительным при изменении окраски индикатора с ярко-желтой на темно-малиновую. В качестве отрицательного контроля используется культура *E. coli*. Оксидазный тест проводится нанесением капли 1% водного раствора тетраметилпарафенилендиамина гидрохлорида на исследуемые колонии непосредственно на поверхности чашки. Через 20–30 секунд оксидазопозитивные колонии *H. pylori* окрашиваются в темный цвет. Контролем служат суточные агаровые культуры *E. coli* (негативный контроль) и *P. aeruginosa* (позитивный контроль). Тест на каталазную активность проводится в капле H₂O₂ на стекле: через 3–5 секунд в взвеси каталазопозитивной культуры *H. pylori* происходит образование пузырьков газа. Позитивным контролем служит суточная агаровая культура *E. coli*, негативным – любой стрептококк.

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

Результаты исследования

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).

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.

Гистологическое заключение оказалось информативным у 179 участников исследования. Из них инфицирование *H. pylori* было подтверждено гистологическим методом при окраске биоптата по Романовскому-Гимзе у 124 пациентов (69,3%), микробиологическим методом *H. pylori* был обнаружен у 116 пациентов (64,8%). Гистологическое и микробиологическое подтверждение *H. pylori*-инфекции получили 83 пациента, что составило 46,4% (табл. 1).

Таблица 1. Диагностика *H. pylori*-инфекции гистологическим и микробиологическим методом

179 пациентов с информативным гистологическим заключением и результатами посевов биоптатов для микробиологического исследования		
гистологический метод	гистологический + микробиологический	микробиологический метод
69,3% (n=124)	46,4% (n=83)	64,8% (n=116)

Из 124 пациентов, у которых *H. pylori* обнаружен гистологическим методом, отсутствие роста *H. pylori* при посеве биопсийного материала отмечен у 33% пациентов (n=41) (рис. 1).



Из 116 пациентов, у которых *H. pylori* обнаружен микробиологическим методом, отрицательный гистологический результат зарегистрирован у 28,4% пациентов (n=33).



Таким образом, полученные результаты подтверждают отсутствие универсального инвазивного метода диагностики *H. pylori*-инфекции. Следует помнить о вероятности получения ложноотрицательного результата. С целью повышения точности диагностики *H. pylori*-инфекции следует использовать комбинацию различных инвазивных методов.

Обсуждение

Морфологический метод

Среди инвазивных способов диагностики *H. pylori* наибольшее распространение получил гистологический метод. С помощью гистологического метода можно констатировать наличие в биоптате *H. pylori* с определением степени обсемененности, исключить болезнь Крона, НПВП-гастропатию, а в случае наличия язвы в желудке множественная биопсия с гистологическим исследованием является обязательной для исключения злокачественного новообразования [3]. Общее число ложноположительных и ложноотрицательных результатов при гистологическом исследовании, по данным литературы, в среднем составляет 4–11%. Причиной неадекватной диагностики чаще всего бывает плохое качество, недостаточный объем биопсийного материала, повреждение его в процессе обработки или окраски [3]. Нередко вследствие малого количества микроорганизмов и их атипичной морфологии (кокковые формы), что бывает при проведении эрадикацион-

ной терапии и длительном применении ИПП или антибиотиков, возможно получение ложноотрицательных результатов [7]. Кроме того, *H. pylori* колонизирует не только пилорический отдел, но и фундальный. Почти у 10% больных удается выявить *H. pylori* лишь в фундальных биоптатах. Из этого следует, что для уменьшения числа ложноотрицательных заключений, особенно после завершения курса антибактериальной терапии, нельзя ограничиваться изучением только антральных биоптатов, необходимо исследовать и фундальную слизистую оболочку [2].

М-микрофлора желудка и 12-перстной кишки представлена не только *H. pylori*, но и стафилококками, стрептококками, микрококками, лактобациллами, энтеробактериями, грибами рода *Candida* [5]. Кроме того, описаны случаи обнаружения в гастробиоптатах микроорганизма *Selenomonas species*, который по своим морфологическим свойствам (грамм-отрицательная, изогнутая палочка) схож с *H. pylori*. У человека он в норме обнаруживается в составе микробиоценоза ротовой полости, поэтому он может свободно перемещаться в желудок и выявляться в гастробиоптатах при морфологическом исследовании. Однако, в отличие от *H. pylori*, *Selenomonas species* не обладает уреазной и оксидазной активностью, поэтому отличить его от *H. pylori* можно только с помощью бактериологического метода исследования на этапе идентификации выделенной чистой культуры [6].

Микробиологический метод

Ряд исследователей называют микробиологический метод выявления *H. pylori* «золотым стандартом», что соответствует действительности, так как он обладает 100% специфичностью. В широкой клинической практике микробиологическая диагностика *H. pylori* используется редко ввиду трудоемкости, дороговизны и длительности получения результата. Однако микробиологическое исследование играет определяющую роль для определения чувствительности штамма *H. pylori* к антибактериальным лекарственным средствам, что особенно актуально в настоящее время в связи с возрастающей антибиотикорезистентностью *H. pylori* [3].

Микробиологический метод включает в себя несколько стадий, нарушение одной из них может оказаться критичным для финального результата. В связи с этим чувствительность метода зависит от большого числа условий. Процент высеваемости *H. pylori* по данным различных авторов колеблется от 23,5 до 90%. Безусловно, что различия этих показателей связаны и с качеством забора биопсийного материала, транспортировкой и хранения, а также с опытом работы по выделению *H. pylori* [3].

С целью исключения ложноотрицательных результатов за 2 недели до проведения микробиологического исследования следует отменить прием ингибиторов протонной помпы, пациент также не должен получать антибактериальные препараты. Одним из возможных источников ложноположительных результатов возможна трансмиссия *H. pylori* через эндоскоп, что может наблюдаться при всех инвазивных методах [7].

Уреазный тест

Получение положительных результатов быстрого уреазного теста при отсутствии определения возбудителя гистологическим и микробиологическим методами можно объяснить тем, что быстрым уреазным тестом определяются продукты жизнедеятельности *H. pylori*, а не сам микроорганизм, который может не попасть в биоптат, исследуемый с помощью гистологического или микробиологического метода. Получение положительного результата быстрого уреазного теста также связано и с другими уреазопродуцентами (кокки, протеи и т.д.) и требует дополнительной гистологической или микробиологической диагностики [7].

Выводы

1. Среди инвазивных методов диагностики *H. pylori*-инфекции не существует универсального метода.
2. Для диагностики *H. pylori*-инфекции гистологическим методом следует осуществлять забор биоптатов из антрального и фундального отделов желудка с целью снижения частоты ложноотрицательных результатов.
3. При получении положительного результата гистологического исследования следует помнить о возможности обнаружения представителей М-микрофлоры и *Selenomonas sps.*, что требует дополнительного микробиологического исследования с целью уменьшения частоты ложноположительных результатов.
4. Следует помнить о возможности формирования коковых форм *H. pylori*, которые, помимо своей атипичной морфологии, не культивируются, но обладают патогенными свойствами и формируются в ответ на неадекватную эрадикационную терапию, а также прием антибиотиков и ингибиторов протонной помпы, что снижает частоту выделения *H. pylori* микробиологическим методом и является причиной ложноотрицательных результатов.
5. С целью уменьшения вероятности получения ложноотрицательных результатов диагностики *H. pylori*-инфекции рекомендуется применение комбинации различных инвазивных методов.
6. Возникает необходимость использования неинвазивных методов диагностики *H. pylori*-инфекции в широкой клинической практике.

ЛИТЕРАТУРА

1. Аруин Л.И., Исаков В.А. Оценка обсемененности слизистой оболочки желудка *Helicobacter pylori* и активности хронического гастрита // Архивы патологии. -1995. - № 3. - С. 75-76.
2. Аруин Л.И., Капуллер Л.Л., Исаков В.А. Морфологическая диагностика болезней желудка и кишечника. М. «Триада-Х», 1998. - 112 с.
3. Исаков В.А., Домарадский И.В. Хеликобактериоз. М.: ИД Медпрактика. – М, 2003. - 412 с.
4. Кудрявцева Л.В., Щербаков П.Л., Иваников И.О., Говорун В.М. *Helicobacter pylori* - инфекция: современные аспекты диагностики и терапии: Пособие для врачей. М., 2004. - 41 с.
5. Циммерман Я.С., Субботина Л.В., Несчислав В.А.. Микробный антагонизм и обоснование включения пробиотиков в комплексное лечение *Helicobacter pylori* – зависимых заболеваний // Клиническая медицина. - 2010. - № 4. - С. 35-42.
6. Andersen L.P., Lange P., Tvede M. *Selenomonas* may puzzle the diagnosis of *Helicobacter pylori* in gastric mucosa // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 2010. - Vol. 20. – P. 891–892.
7. Mégraud F., Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing // Clin. Microbiol. Reviews. – 2007. - Vol. 20, N 2. – P. 280-322.