

УДК 61:577.1

©Семенова, Шубина

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ К ТЕРАПИИ ИНФЕКЦИИ *HELICOBACTER PYLORI*. НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМЫ С ПРИМЕНЕНИЕМ МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА

Н.В. Семенова, Н.А. Шубина

ГУ НИИ биомедицинской химии РАМН им. В.Н. Ореховича,
119121, г. Москва, ул. Погодинская, д.10; тел.: 939-70-51; эл. почта: choun@mail.ru

Получен большой объем количественных данных о распространенности инфекции бактерии *Helicobacter pylori* и проявлениях резистентности к проводимой антибактериальной терапии по результатам хромато-масс-спектрометрического [¹³C]-уреазного дыхательного теста. Показано, что контроль эрадикации (уничтожения) бактерии, который необходимо проводить в обязательном порядке в установленные протоколом сроки и, при необходимости, терапия второй линии, позволяют исключить рецидивы болезней, ассоциированных с *Helicobacter pylori*, в среднем у 10% пациентов.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, резистентность, дыхательный тест.

ВВЕДЕНИЕ. В настоящее время существует несколько фармакологических эрадикационных комбинаций терапии больных язвенной болезнью желудка и двенадцатиперстной кишки, а также гастрита, ассоциированных с инфекцией *Helicobacter pylori*. Эти комбинации рекомендованы к применению решениями Маастрихтской согласительной конференции Европейской группы по изучению *Helicobacter pylori* и приняты в России. В большинство схем антихеликобактерной терапии включаются блокаторы протонного насоса, которые, повышая рН содержимого желудка, создают неблагоприятные условия для жизнедеятельности бактерии, а также повышают эффективность действия многих антибактериальных препаратов. Так, сочетание ингибиторов протонной помпы с двумя антихеликобактерными препаратами считается классической схемой первой линии терапии. При использовании ее в течение 7-14 дней частота эрадикации достигает 80-92% [1]. После эрадикации бактерии *Helicobacter pylori* у больных гастритом и язвенной болезнью, как правило, наступает длительная ремиссия. При этом контроль качества антихеликобактерной терапии должен проводиться в строго установленные сроки [2,3]. Однако в клинической практике контроль эффективности антихеликобактерной терапии часто опускается либо в связи с эндоскопическим установлением факта рубцевания язв, либо в связи с улучшением самочувствия больного. Остаточная инфекция часто приводит к рецидивам заболевания, и при этом может иметь место приобретенная резистентность к лекарственным препаратам. На примере количественных данных о содержании бактерии в организме инфицированных людей до и после лечения, авторы подчеркивают необходимость обязательности проведения контроля качества антихеликобактерной терапии, что позволяет заметно (до 10%) снизить число случаев рецидивов болезней желудка и двенадцатиперстной кишки, ассоциированных с *Helicobacter pylori*.

Наличие бактерии *Helicobacter pylori* в организме определяют по результатам анализа с применением ряда аналитических методов (гистологический, культуральный, серологический, ПЦР, [¹⁴C]- и [¹³C]-уреазные дыхательные тесты, CLO-тест и др.). При контроле качества лечения предпочтение должно быть отдано неинвазивным методам исследования, как более гигиеничным. [¹³C]-уреазный дыхательный тест является одним из лучших среди других методов контроля качества лечения как в виду его аналитических свойств, так и в виду комфортности и безопасности для пациента.

МЕТОДИКА. Хромато-масс-спектрометрический [¹³C]-уреазный дыхательный тест, основанный на исследовании состава выдыхаемого воздуха, относится к простым и надежным методам исследования *Helicobacter pylori*. Метод основан на приеме внутрь раствора мочевины, помеченной изотопом углерода [¹³C] (уровень обогащения 99% по сравнению с природной распространенностью 1,108%), и последующем разложении мочевины под действием фермента уреазы, выделяемой бактерией в процессе ее жизнедеятельности. Для анализа используется слабый раствор мочевины - 1 мг на 1 кг массы тела, который дают выпить тестируемому.

Helicobacter pylori вырабатывает фермент уреазу, метаболизирующий мочевину. При отсутствии бактерии в желудке обследуемого мочевина не разлагается, выводится из организма, и никаких изменений в составе выдыхаемого воздуха не происходит. При наличии бактерии, под действием выделяемого ею фермента уреазы, происходит разложение мочевины с выделением углекислого газа, который переходит в кровь и выводится из организма через легкие. Помеченный [¹³C] углекислый газ, образованный расщеплением введенной мочевины, согласно формуле $[^{13}\text{C}]\text{O}(\text{NH})_2 + \text{H}_2\text{O} = [^{13}\text{C}]\text{O}_2 + 2\text{NH}_3$, детектируется масс-спектрометром по изотопному отношению $[^{13}\text{C}]/[^{12}\text{C}]$.

Прибор позволяет полностью разделить компоненты выдоха и выделить необходимый для анализа углекислый газ. Для этого проба выдоха в пробирке подается в автодозатор, оборудованный устройством отбора пробы иглой путем прокалывания крышки пробирки. Поток гелия, идущий через капилляр в игле со скоростью 20 мл/мин, вдувается в момент отбора в пробирку с пробой воздуха через боковое отверстие в середине иглы. Плавленный кварцевый капилляр в кончике иглы втягивает в себя разбавленный гелием воздух пробы и направляет его в петлю ввода и далее в газовый хроматограф, который представляет собой 3-х метровую металлическую набивную колонку, где созданы изотермические условия примерно в 100°C и где происходит разделение пробы на компоненты. Выделенный углекислый газ подается к источнику ионов масс-спектрометра, где происходит его ионизация, и далее в коллекторную систему прибора, которая смонтирована на конце вакуумной камеры. Коллекторная система состоит из трех цилиндров Фарадея, строго расположенных таким образом, чтобы одновременно принимать ионные токи трех массовых чисел - 44, 45 и 46, соответствующих атомным массам углекислого газа CO₂ с атомной массой углерода [¹²C], [¹³C] и [¹⁴C] соответственно. Сигналы усиливаются и поступают на устройство, преобразующие напряжение в частоту. Затем происходит измерение сигналов и вычисление их отношений. Наибольший интерес представляет отношение 45/44, т.е. $[^{13}\text{C}]/[^{12}\text{C}]$, которое сравнивается с таким отношением для международного стандарта PDB, что позволяет сравнивать результаты, полученные в разных лабораториях мира.

Результаты измерений изотопного состава представляются в тысячных долях единиц (промилле). Различие в изотопном составе веществ дается выражением:

$$\delta [^{13}\text{C}] (\text{‰}) = [(R_{\text{образца}}/R_{\text{стандарта}}) - 1] \cdot 10^3,$$

где R - отношение $[^{13}\text{C}]/[^{12}\text{C}]$. Решение об инфицировании принимается в том случае, когда имеет место превышение отношения над базисом свыше 3,5 - 5 единиц (промилле).

Результаты выполненных анализов (более 900) на наличие бактерии *Helicobacter pylori* и регистрируемых уровней обсемененности указывают на то, что большинство регистрируемых уровней инфицирования находится в пределах от 5 до 30 промилле. Уровни от 30 до 100 единиц составляют менее 10% случаев (рис. 1). Отмечены также единичные случаи с уровнями более 100 единиц, а также два случая с уровнями более 300 и 600 промилле соответственно.

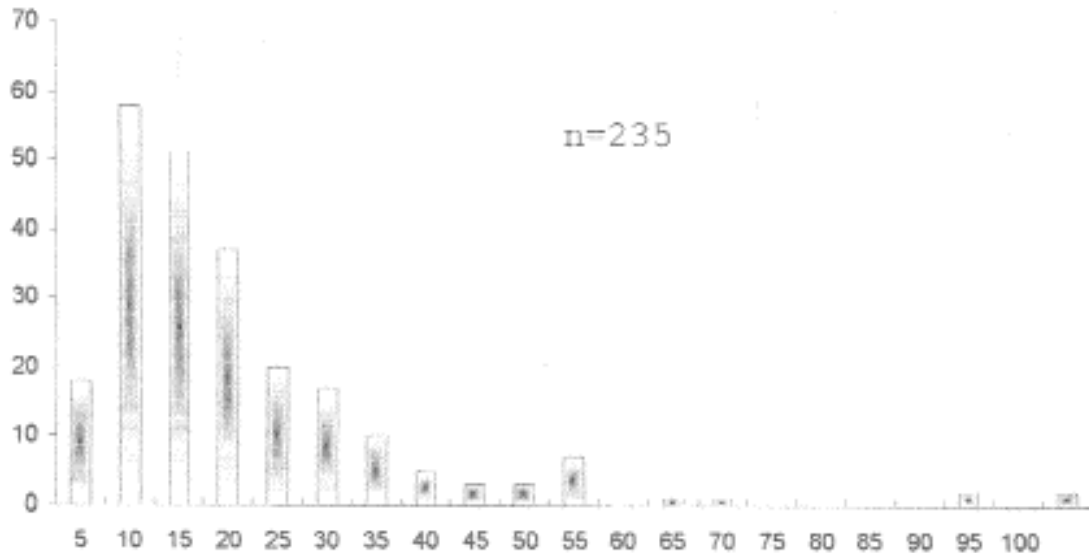


Рисунок 1.

Распределение значений уровня инфицирования бактерией *Helicobacter pylori* по данным ^{13}C масс-спектрометрического теста.

В работе рассмотрена выборка из 235 пациентов (95 женщин и 140 мужчин) в возрасте от 15 до 70 лет с диспепсией и диагнозами - язвенная болезнь желудка и язвенная болезнь двенадцатипёрстной кишки, и гастриты разных типов как в стадии обострения, так и в стадии ремиссии.

Задача анализа наличия в организме бактерии *Helicobacter pylori* методом ^{13}C -хромато-масс-спектрометрического уреазного дыхательного теста сводится к определению максимального значения сдвига изотопного отношения $^{13}\text{C}/^{12}\text{C}$ в выдыхаемом воздухе после приема обогащенной ^{13}C мочевины (далее именуемой маркером). При отсутствии инфекции в организме результаты будут близки к нулевым, а при наличии инфекции будет зафиксировано определенное значение сдвига в изотопном отношении в интервале времени от 1 до 30 минут после приема маркера, и его величина пропорциональна степени обсеменённости бактерией.

Следует отметить, что у носителей бактерии наблюдаются индивидуальные особенности измеряемого уровня, выражающиеся, главным образом, в характере кривых изменения изотопного отношения в течение времени регистрации и времени наступления максимального уровня изотопного отношения, отражающих особенности метаболизма маркера. Все измерения изотопного смещения осуществляются в интервале времени от 10 до 30 минут после приема маркера, поскольку в течение первых 10 минут наблюдается стабильное нарастание изотопного смещения, а спустя 30 минут у абсолютного большинства испытуемых происходит быстрое восстановление изотопного смещения до фоновых значений.

Все наблюдаемые варианты измеренных изотопных смещений мы разделили на 4 типа. Первый тип соответствует распределению с максимумом значений на время измерения в 30 минут после приема маркера (рис. 2). Второй тип распределения также позволяет фиксировать бактерию на момент времени 30 минут после приема маркера, однако максимальное значение содержания бактерии обычно отмечается ранее 30 минут и наблюдается, как правило, на момент

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ В ДИАГНОСТИКЕ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

времени в 10, 15 или 20 минут (рис. 3 а и б). Третий тип распределения характеризуется тем, что на момент времени 30 минут измеряемый уровень содержания бактерии близок к нулю или ниже пороговых значений (3-5 промилле), однако на 10, 15 или 20 минут отмечаются заметные, иногда значительные величины измеряемого уровня (рис. 4). Четвертый тип распределения выделен нами как тип следовых значений со сложным характером распределения в течение измеряемого времени (рис. 5).

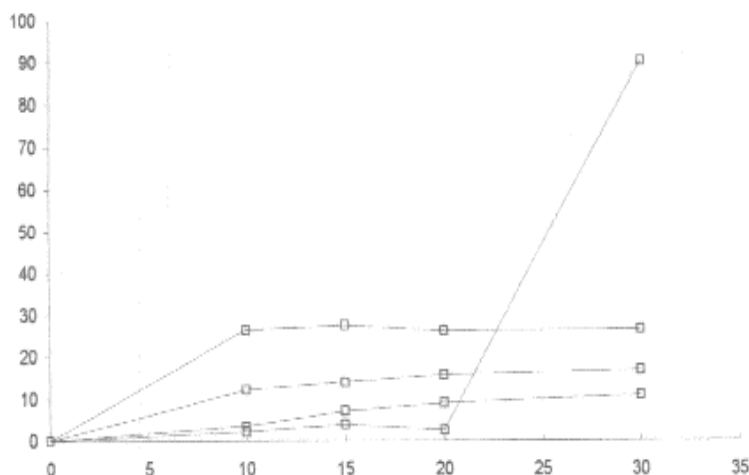


Рисунок 2.

Распределение первого типа функции измеряемого уровня содержания бактерии *Helicobacter pylori* в организме с максимумом значений на время измерения 30 минут после приёма маркера. (По оси X - время после приёма маркера в мин., по оси Y - превышение над базисом по отношению к стандарту PDB, промилле).

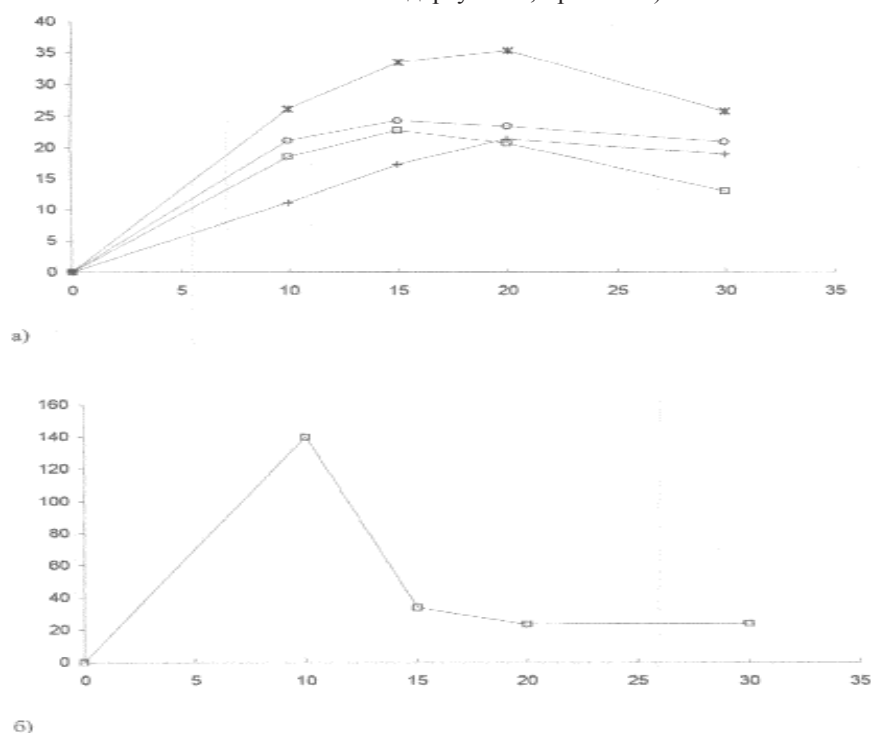


Рисунок 3.

Распределение второго типа функции измеряемого уровня содержания бактерии *Helicobacter pylori* в организме с максимумом значений на время измерения в 10, 15, 20 минут после приёма маркера; на время измерения 30 минут бактерия фиксируется после прохождения максимума. (По оси X - время после приёма маркера в мин., по оси Y - превышение над базисом по отношению к стандарту PDB, промилле).

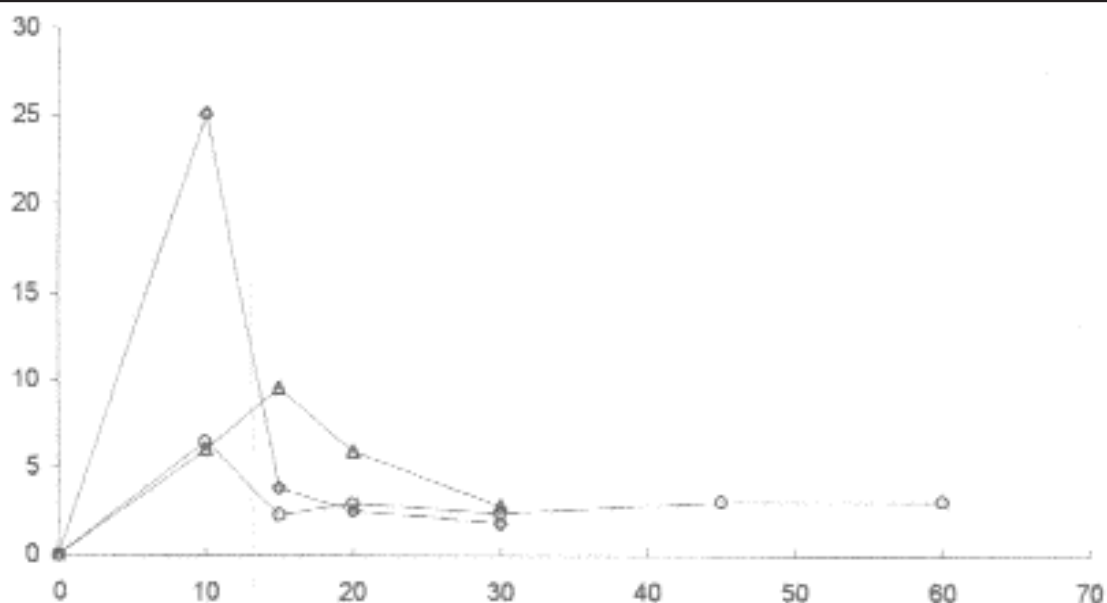


Рисунок 4.

Распределение третьего типа соответствует распределению функции измеряемого уровня содержания бактерии *Helicobacter pylori* в организме с максимумом значений на время измерения в 10, 15, 20 минут после приёма маркера, на момент времени измерения в 30 минут уровень содержания бактерии ниже порогового (3-5 промилле). (По оси X - время после приёма маркера в мин., по оси Y - превышение над базисом по отношению к стандарту PDB, промилле).

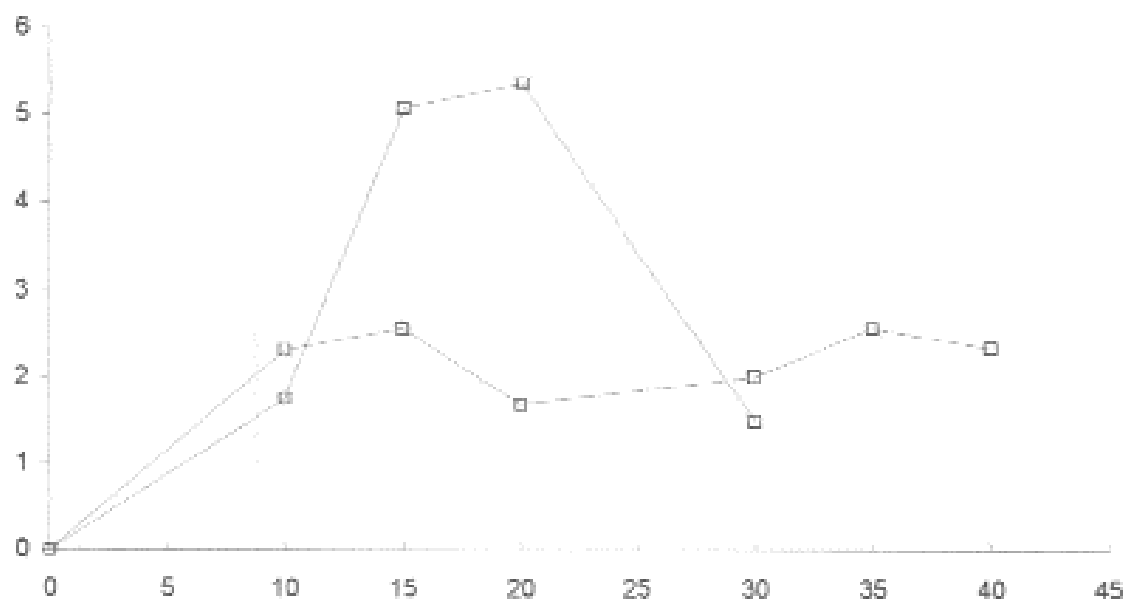


Рисунок 5.

Распределение четвёртого типа функции измеряемого уровня содержания бактерии *Helicobacter pylori* в организме со сложным характером распределения следовых (ниже пороговых) содержаний (3-5 промилле). (По оси X - время после приёма маркера в мин., по оси Y - превышение над базисом по отношению к стандарту PDB, промилле).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. В настоящее время установлено, что важнейшую роль в усилении агрессивных свойств желудочного содержимого и ослаблении защитных свойств слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки играет бактерия *Helicobacter pylori*. Эта бактерия выявляется у 90-95% больных с язвами двенадцатиперстной кишки и у 70-80% пациентов с язвами

желудка [2,3]. Спектр неблагоприятного влияния *Helicobacter pylori* на слизистую оболочку желудка и двенадцатиперстной кишки достаточно многообразен. Эти бактерии вырабатывают целый ряд ферментов (уреаза, протеазы, фосфолипазы), повреждающие защитный барьер слизистой оболочки, а также различные цитокины.

Следует подчеркнуть, что по результатам наших наблюдений не зарегистрировано универсального для всех испытуемых уровня содержания бактерии, при котором наблюдаются выраженные патологические изменения и соответствующие симптомы. Это значит, что болезни желудка и 12-перстной кишки могут прогрессировать при относительно низких уровнях содержания бактерии, и наоборот, индивидуумы с относительно высокими значениями регистрируемого уровня содержания бактерии могут не иметь выраженных патологических изменений. Можно предполагать, что определяющими факторами для патогенеза являются штамм бактерии и иммунитет человека. Таким образом, величина уровня содержания бактерии у конкретного индивидуума является индивидуальной характеристикой.

Мы зарегистрировали “колебательный” характер жизни колонии бактерии в интервале времени от 1 недели и более. Следует подчеркнуть, что при наличии таких колебаний имеет место тенденция к установлению “спокойных” уровней после прохождения “возмущенных”. Так, повышенные более чем в два раза регистрируемые уровни содержания бактерии (при отсутствии какого-либо лечения) у одних и тех же носителей, в течение одной-четырех недель вернулись к исходным значениям. Мы связываем такое поведение колонии бактерии *Helicobacter pylori*, главным образом, с изменением психофизического состояния ее носителя, например, наличия у него стрессовых ситуаций [4]. Прослеживается прямая связь “возмущенных” уровней содержания бактерии и проявлением патологических изменений в организме инфицированных людей.

Современная терапия болезней желудка и двенадцатиперстной кишки связана с эрадикацией *Helicobacter pylori* и внедрением мощных антисекреторных препаратов. Современные подходы к диагностике и лечению инфекции *Helicobacter pylori*, отвечающие требованиям доказательной медицины, отражены в итоговом документе Маастрихтской конференции 2000 г. [5]. В нем особо отмечено, что эрадикационная терапия при язвенной болезни является необходимым лечебным мероприятием. Проведение эрадикации у больных язвенной болезнью дает существенный экономический эффект при сравнении с проведением поддерживающей или курсовой терапии антисекреторными средствами [6].

В последние годы при проведении эрадикационной терапии выявились серьезные проблемы, связанные с растущей устойчивостью штаммов *Helicobacter pylori* к антибактериальным препаратам, в первую очередь, метронидазолу (более 30% случаев) и кларитромицину (более чем в 10% случаев). В практическом плане это означает существенное снижение частоты эрадикации при применении схем, в состав которых входили указанные антибактериальные препараты [7-15].

В клинической практике такие случаи часто оказываются не выявленными, поскольку контроль эффективности антихеликобактерной терапии часто опускается либо в связи с эндоскопически установленным фактом рубцевания язв, либо в связи с улучшением самочувствия больного. Спустя значительное время (более полугода) после лечения антибактериальными средствами авторам часто приходится регистрировать остаточную инфекцию *Helicobacter pylori*, которая, будучи непролеченной терапией второй линии, часто приводит к рецидивам заболевания, и при этом приобретенная резистентность к лекарственным препаратам может значительно усложнить проведение нового терапевтического курса.

При сохранении *Helicobacter pylori* в слизистой оболочке желудка показано проведение повторного курса эрадикационной терапии с применением терапии второй линии с последующим контролем его эффективности также через 4-6 недель. Только строгое соблюдение такого протокола дает возможность провести

надлежащим образом санацию слизистой оболочки желудка и предотвратить риск возникновения рецидивов язвенной болезни [16].

По мнению авторов, число случаев резистентности к проводимой терапии можно заметно снизить путем соблюдения предписанных Маастрихтским соглашением процедур, в частности, введения в обязательную практику контроля эрадикации *Helicobacter pylori*. Протокол эрадикационной терапии предполагает обязательный контроль ее эффективности, который проводится через 4-6 недель после ее окончания (в этот период больной не принимает никаких антибактериальных препаратов). “Золотым стандартом” диагностики на данном этапе становится дыхательный тест [17].

По данным хромато-масс-спектрометрического [^{13}C]-уреазного дыхательного теста все наблюдаемые случаи резистентности ($\approx 10\%$ всех больных) к антихеликобактерной терапии можно условно разделить на 3 группы.

1 – Не наблюдается какой-либо реакции на лечение (3-5 % случаев).

2 – Имеет место снижение уровня содержания бактерии от первоначально установленного до какого-то определенного уровня, выше порогового значения (5-10 % случаев).

3 – Парадоксальная реакция на лечение с увеличением регистрируемого уровня после приема антихеликобактерной терапии (1 % случаев).

Первая группа пациентов, возможно, нуждается в подборе индивидуальной терапии, пролонгировании курса эрадикации и при отсутствии эффекта – в назначении поддерживающей терапии.

Вторая группа пациентов относится к категории, требующей в обязательном порядке терапию второй линии в виде схемы из 4 препаратов, содержащую блокаторы протонного насоса, препараты висмута, метронидазол и тетрациклин. В качестве второго лечебного курса могут быть использованы и тройные схемы лечения на основе блокаторов протонного насоса. Минимальная продолжительность тройных схем и схемы квадротерапии составляет 7 дней. В случае отсутствия эффекта при проведении второго курса последующая тактика лечения решается индивидуально в каждом конкретном случае [2]. Данная группа пациентов поддается лечению и его необходимо провести в обязательном порядке.

Следует подчеркнуть, что существует слабая прямо пропорциональная связь между высокой степенью обсемененности бактерией *Helicobacter pylori* (свыше 100 единиц) и остаточной обсемененностью после эрадикации. При более низких степенях обсемененности такой связи не обнаруживается (рис. 6).

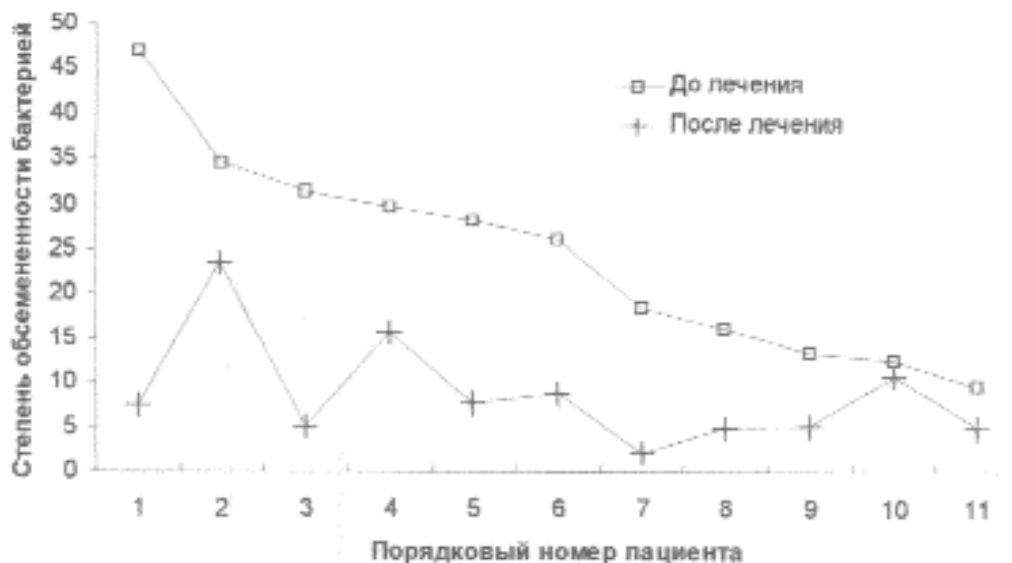


Рисунок 6.

Отсутствие связи между первоначальным и остаточным (после лечения) уровнями степеней обсемененности бактерией *Helicobacter pylori* ($R^2=0,158$).

МАСС-СПЕКТРОМЕТРИЯ В ДИАГНОСТИКЕ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ

Третья группа пациентов встречается относительно редко, но обращает на себя внимание резким возрастанием измеряемого уровня содержания бактерии спустя 3-4 недели после проведенного лечения. Часто специалисты склонны интерпретировать такие результаты как симуляцию лечения. Однако наши данные свидетельствуют о том, что при последовательном соблюдении режима современной антихеликобактерной терапии наблюдались случаи парадоксальной реакции. Среди этой группы пациентов мы отмечали значительное (трех- и четырехкратное) увеличение уровня измеренной активности колонии после проведения лечения по тройной схеме эрадикации, включающей нексиум + кларитромицин + амоксициллин (таблица).

Таблица. Примеры увеличения колонии бактерии *Helicobacter pylori* после проведения лечения по тройной схеме эрадикации у больных пациентов третьей группы.

Пациент	Регистрируемый уровень активности колонии, DOB, %	
	До лечения	После лечения
X	14.5	67.2
Y	29.3	90.4
Z	17.3	51.7

Такая картина распространенности бактерии после лечения может объясняться тем, что при наличии штамма бактерии, резистентного к проведенной терапии, и “колебательного” характера содержания бактерии во времени, изученного и описанного авторами ранее [4], измерения после лечения были сделаны в момент относительного увеличения (разрастания) колонии. В подтверждение этого авторы располагают данными измерений содержания бактерии для одного из испытуемых этого типа (14 ед. до лечения), резким возрастанием уровня после лечения (70 ед.) и последующего возвращения к исходному уровню (15 ед.) спустя приблизительно месяц на фоне отсутствия дополнительного лечения. Вероятно, последний уровень для указанного индивидуума являлся “невозмущенным”.

Рекомендации по ведению пациентов данного типа, вероятно, схожи с рекомендациями для пациентов первого типа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ. Среди 10-20% пациентов, резистентных к антихеликобактерной терапии, выявлены три группы, различающиеся по типу реакции на лечение по отношению к исходному (до лечения) содержанию бактерии - неизменный, заметно пониженный и повышенный. Особое внимание обращает на себя группа из 5-10%, у которой наблюдается остаточная обсемененность после заметного снижения первоначального уровня содержания бактерии. Процедура контроля эрадикации бактерии, которую необходимо проводить в обязательном порядке в установленные протоколом сроки и проведение терапии второй линии позволит исключить рецидивы болезней, ассоциированных с *Helicobacter pylori*, в среднем у 10% пациентов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Григорьев П., Яковенко Э. (2001) Медицинская газета, № 16-17, 7.3.
2. Рекомендации по диагностике и лечению язвенной болезни. (2002) М., 30 с.
3. Протоколы по диагностике и лечению больных с заболеваниями органов пищеварения. (2001) М., 52 с.
4. Семенова Н.В., Шубина Н.А. (2004) Физиология человека, № 2, 129-134.
5. Malfertheiner P., Megraud F, O'Morain C., et al. (2002) Aliment. Pharmacol. Ther., 16 (2), p. 167-80.

6. Ивашкин В.Т., Лапина Т.Л. (2002) Болезни органов пищеварения, **4**(1), 20-24.
7. Craft J.C., Olson C., Siepinan N., Edwards A. (1995) Am. J. Gastroenterol., **90**, 1579.
8. Debets-Ossen Kopp Y.J., Sparrius M., Kusters J.G., Kolkman J.J., Vandenbrouckegrauls C.M.J.E. (1996) FEMS Microbiol. Lett., **142**, 37-42.
9. Glupczynski Y. (1992) Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis., **11**, 777-781.
10. Glupczynski Y., Burette A., Koster E., Nyst J.-F., Deltenre M., Cadranel S., Bourdeaux L., DeVos D. (1990) Lancet, **335**, 976-977.
11. Graham D.Y., de Boer W.A., Tytgat G.N. (1996) Am. J. Gastroenterol., **91**, 1072-1076.
12. Karim Q.N., Logan R.P.H. (1996) Gut, **39**, A51.
13. Reddy R., Osato M., Gutierrez O., Kirn J.G., Graham D.Y. (1996) Gastroenterology, **10**, A236.
14. Vasquez A., Valdcí Y., Gilman R.H., McDonald J.J., Westblom T.V., Berg D., Mayla H., Gutierrez V. (1996) J. Clin. Microbiol., **34**, 1232-1234.
15. Witteman E.M., Hopman W.P., Besc M.C., de Koning R.W., Tytgat G.N., Janssen A.J., J.B. Jansen (1993) Aliment. Pharmacol. Ther., **7**, 683-687.
16. Рекомендации по диагностике и лечению инфекции *Helicobacter pylori* у взрослых при язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки (1998) Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии, **1**, 105-107.
17. Рапопорт С.И., Цодиков Г.В., Ходеев Ю.С., Зякун А.Я., Семенова Н.В., Шубина Н.А. (2003) Клин. мед., **80**(1), 19-24.

Поступила: 14. 09. 2004

**RESISTANCE FOR THERAPY OF *HELICOBACTER PYLORI* INFECTION.
NEW POSSIBILITIES FOR PROBLEM SOLUTION USING THE
MASS-SPECTROMETRY METHOD**

N.V. Semenova, N.A. Shubina

V.N. Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences,
Pogodinskaya, 10, Moscow, 119121 Russia; tel.: (495) 939-70-51; e-mail: choun@mail.ru

The chromato-mass-spectrometric [¹³C] urease breath test is a promising tool for quantitative analysis of abundance of bacteria *Helicobacter pylori* and resistance to the antibacterial therapy. It was shown that the control of bacteria eradication at the time intervals recommended by conventional protocol and the second line therapy allow excluding the repeated attacks of disease associated with *Helicobacter pylori* in 10% of patients.

Key words: bacteria *Helicobacter pylori*, resistance, breath test