

УДК 616.34-07:579.835

МОЛЕКУЛЯРНАЯ ДЕТЕКЦИЯ БАКТЕРИЙ РОДА HELICOBACTER ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ ЖЕЛУДОЧНО-КИШЕЧНОГО ТРАКТА

Исаева Г.Ш., Шагимарданова Е.И., Ширшикова Т.В., Фазульязнова А.И.,
Ризванов А.А., Селькова Е.П.

*Казанский государственный медицинский университет
Казанский (Приволжский) федеральный университет
ООО «Лечебно-диагностический центр «Фарм-Т»
Московский НИИ микробиологии и эпидемиологии им. Г.Н. Габричевского*

Цель исследования: обнаружение бактерий рода *Helicobacter* в желчи больных с различной патологией желудочно-кишечного тракта. Материалом для исследования служили образцы желчи от 33 пациентов. Детекцию хеликобактеров проводили с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). ДНК бактерий рода *Helicobacter* была обнаружена в 12 случаях (36,4%). 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 7 случаях образцы были позитивными в отношении гена 23S рРНК *H.pylori* и столько же в отношении гена *ureB H.rappini*. Бактериальная микст-инфекция *H.pylori +H.rappini* обнаружена у 5 больных. Все образцы в отношении генов *cdtB H.pullorum* и *cdtB H.bilis* были негативными. Полученные результаты позволяют сделать первоначальные выводы о возможном участии бактерий рода *Helicobacter* в патогенезе заболеваний желудочно-кишечного тракта, но необходимы дальнейшие исследования.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, энтерогапатические хеликобактеры, желчь, ПЦР.

MOLECULAR DETECTION OF HELICOBACTER GENUS BACTERIA IN GASTROINTESTINAL TRACT DISEASES

Isaeva G.Sh., Shagimardanova E.I., Shirshikova T.V.,
Fazulzyanova A.I., Rizvanov A.A., Selkova E.P.

Aim: the detection bacteria of *Helicobacter* genus in the bile of the patients with different gastrointestinal diseases. We examined the bile samples obtained from 33 patients (M-11, F-22, mean age - 43,6 ±0,9). The presence of *Helicobacter* species was tested by polymerase chain reactions (PCR). Gene 16S rDNA of *Helicobacter* genus was found in 12 cases (36,6%) of bile samples. Samples generating a positive result with the *Helicobacter* genus specific PCR were subsequently analyzed with species specific primers for detection of *H. bilis*, *H. pullorum*, *H. pylori* and *H. rappini*. 23S rRNA of *H.pylori* was found in 7 cases, the result for gene *ureB* of *H.rappini* was the same. Mix-infection *H.pylori +H.rappini* was found in 5 patients. All samples for genes *cdtB* of *H.bilis* and *H.pullorum* were negative. Conclusion. Due to the received data we can draw initial conclusion about the possible role of helicobacters in the pathogenesis of gastrointestinal tract's diseases, but the further researches are necessary.

Key words: *Helicobacter pylori*, enterohepatic helicobacters, bile, PCR

В зависимости от занимаемой экологической ниши все бактерий рода *Helicobacter* условно разделяют на «желудочные» и «внежелудочные» или энтерогапатические. Последние, а их насчитывают более двадцати видов, составляют большую часть известных на сегодняшний день представителей этого рода. Эволюционно эти виды приобрели способность колонизировать кишечник и желчевыводящие пути животных, но некоторые из

них обнаружены у человека. Данные последних исследований указывают на возможное участие хеликобактеров в патогенезе заболеваний гепатобилиарной системы [6; 13; 14]. Серологические исследования, проводимые различными исследователями, указывают на значительное превышение титров антител к поверхностным протеинам *H.pylori*, *H.bilis*, *H.hepaticus*, *H.pullorum* в группе пациентов с хроническими заболеваниями гепатобилиарной системы по сравнению с группой здоровых доноров [1; 18; 19; 21]. С помощью молекулярно-генетических исследований в желчи больных с различными заболеваниями гепатобилиарной системы обнаруживают ДНК *H.pylori* и энтерогапатических хеликобактеров, на результаты этих исследований крайне противоречивы [12].

Целью данного исследования стало обнаружение бактерий рода *Helicobacter* в желчи больных с различной патологией желудочно-кишечного тракта.

Материал и методы исследования

Было обследовано 33 пациента, среди которых 11 мужчин и 22 женщины, обратившихся в лечебные учреждения г. Казани. Средний возраст составил $43,6 \pm 0,9$ года. Среди обследованных пациентов у 21 больного была выявлена патология со стороны гепатобилиарной системы в виде хронического некалькулезного холецистита (ХНХ) ($n=13$), хронического вирусного гепатита С ($n=7$) и хронического гепатита невыясненной этиологии, ассоциированного с хроническим панкреатитом ($n=1$). Группу пациентов без патологии гепатобилиарной системы составили 12 больных с диагнозами хронический панкреатит ($n=4$), хронический гастродуоденит ($n=4$), спаечная болезнь с дискинезией толстого кишечника ($n=2$), гастроэзофагорефлюксная болезнь ($n=1$) и железодефицитная анемия ($n=1$). Материалом для исследования служили образцы желчи, взятые при дуоденальном зондировании (порции В и С). Для молекулярно-генетического исследования пробы желчи помещали в пробирки типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл, маркировали и до транспортировки хранили при $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ не более одной недели. Выделение ДНК из биопроб (100 мкл желчи) производили сорбционным способом с использованием набора «Хеликопол» (НПФ «Литех», г. Москва) в соответствии с рекомендациями производителя. Для этого к 0,1 мл цельной желчи (каждую порцию анализируют отдельно) добавляли 0,9 мл физиологического раствора, центрифугировали при 13000 об/мин в течение 10 минут, затем удаляли супернатант и полученный осадок использовали для выделения ДНК. Далее осадок желчи помещали в 100 мкл лизирующего буфера, включающего 10 мкл Tris HL pH 8,8, 25 мМ ЭДТА, 100 мкг/мл протеиназы К, и инкубировали до полного растворения при $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 20 минут. К раствору добавляли 20 мкл водной суспензии сорбента и 500 мкл

буфера, состоящего из 10 мМ Tris HL pH 8,0, 5,5 М гуанидинционата, 10 мМ ЭДТА. Суспензию инкубировали при комнатной температуре в течение 10 минут, периодически встряхивая, после чего осаждали сорбент центрифугированием на микроцентрифуге в течение 15 секунд при 13 тыс. об/мин. Супернатант удаляли с помощью вакуумного насоса, а сорбент дважды промывали 70%-ным этанолом и высушивали при 56 °С около 15 минут. Для элюции ДНК с сорбента в пробирки добавляли 50 мкл ТЕ-буфера, тщательно перемешивали на вортексе и инкубировали в течение 5 минут при 55 °С в термостате. Супернатант отделяли центрифугированием. Полученный раствор, снятый с сорбента, переносили в 0,5-мл пробирку и хранили при -20 °С.

Первый этап молекулярно-генетического исследования включал проведение универсальной ПЦР F2/R4 для амплификации фрагмента 16S рРНК размером 1456 п.о. с использованием праймеров, предложенных М. Rocha и соавт., F2-16S-СНРЕС АТСТТGGСТСАGAGTGAACG и R4-16S-СНРЕС ССТАСGGTTАССТТGTTАСGАС. Амплификацию проводили по следующей программе: 94 °С – 4 минуты; 94 °С – 30 сек, 60 °С – 30 сек, 72 °С – 80 сек в течение 40 циклов [20]. Реакцию ПЦР проводили в общем объеме 25 мкл в смеси, содержащей 1×реакционный буфер, 0,2 мМ смеси диоксинуклеозид трифосфатов, 2,5 мМ MgCl₂, 0,5 ед. Taq полимеразы, по 0,5 мкМ каждого праймера и 10 нг ДНК в амплификаторе MJ Mini (BioRad).

Следующим этапом было проведение родоспецифичной ПЦР (С97/С98) с позитивными в реакции F2/R4 образцами ДНК для выявления фрагмента 16S рРНК бактерий рода *Helicobacter* размером 398 п.о. с использованием праймеров С97 GСТАТGАСGGGТАТСС и С98 GАТТТТАССССТААССА, предложенных Fox J.G. и соавт. [5]. Амплификацию осуществляли по следующей программе: 94 °С – 4 минуты; 94 °С – 30 сек, 54 °С – 90 сек, 72 °С – 60 сек в течение 35 циклов.

Образцы ДНК, имеющие положительный результат в специфичной ПЦР для рода *Helicobacter*, подвергли видоспецифической ПЦР с целью детекции четырех видов хеликобактеров *H. bilis*, *H. pullorum*, *H. pylori* и *H. (Flexispira) garrini*.

Детекция *H. pylori*. Определяемыми фрагментами ДНК являлись гомологичные участки гена 23S рРНК *H. pylori* размером 267 п.о. Видоспецифическую ПЦР проводили с применением праймеров НPY S АGGТТАAGAGGATGCGTCAGTC и НPY А СGСАТGАТАТСССАТТАGСАGТ, предложенных А. Menard и соавт. [16]. Амплификацию осуществляли по следующей программе: 94 °С – 4 минуты; 94 °С – 60 сек, 55 °С – 60 сек, 72 °С – 60 сек в течение 40 циклов.

Детекция *H. bilis*. Определяемыми фрагментами ДНК являлись гомологичные участки гена *cdtB* *H. bilis* размером 151 п.о. Видоспецифичную ПЦР проводили с применением

праймеров F2-cdtB-bilis CGAATCTATTATCCGGGCTTG и R2-cdtB-bilis GCCAAGCGAGTTCTATCATTAG, предложенных М. Rocha и соавт. по следующей программе: 94 °С – 4 минуты; 94 °С – 30 сек, 60 °С – 60 сек, 72 °С – 30 сек в течение 40 циклов [20].

Детекция *H. pullorum*. Определяемыми фрагментами ДНК являлись гомологичные участки гена cdtB *H. pullorum* размером 140 и 148 п.о. Видоспецифическую ПЦР проводили с применением праймеров F1-cdtB-pullorum GTCTTTTGAGTGGATTGGATTCT, F2-cdtB-pullorum GCCAGCAAGTCTTTTGAGTG и R2-cdtB-pullorum CACTCCGGGTGCTTGTGTAT, предложенных М. Rocha и соавт. по следующей программе: 94 °С – 4 минуты; 94 °С – 30 сек, 60 °С – 60 сек, 72 °С – 20 сек в течение 40 циклов [20].

Детекция *H. garppini*. Определяемыми фрагментами ДНК являлись гомологичные участки гена ureB *H. garppini* размером 101 п.о. Видоспецифическую ПЦР проводили с применением праймеров F1-ureB-garppini GATGATTAGGGCGACACAGC и R2-ureB-garppini CCCCAGATTCTATCTGCTTACTC, предложенных М. Rocha и соавт. по следующей программе: 94 °С – 4 минуты; 94 °С – 30 сек, 60 °С – 60 сек, 72 °С – 10 сек в течение 40 циклов [20].

Выявление амплифицированных фрагментов осуществляли путем их электрофоретического разделения в 2%-ном агарозном геле с добавлением бромистого этидия и флуоресцентной визуализацией в виде светящихся полос под действием ультрафиолетового света. Результаты документировали с помощью видеосистемы для регистрации гелей Gel Imager 2 (Helicon).

Результаты и их обсуждение

При ПЦР-исследовании образцов желчи, отобранных у 33 пациентов, универсальная F2/R4 реакция была положительной в 15 случаях. Последующая реакция C97/C98 выявила ДНК бактерий рода *Helicobacter* в 12 случаях (36,4%), из них в 2 образцах порции В и в 9 образцах порции С. В группе больных с патологией гепатобилиарной системы ДНК хеликобактеров обнаружена в 8 случаях, из них в 6 случаях хронического некалькулезного холецистита и в 2 случаях хронического гепатита, при этом в одном случае ассоциированного с вирусом гепатита С. Среди больных без патологии гепатобилиарной системы ДНК бактерий рода *Helicobacter* обнаружена у больных хроническим панкреатитом и дискинезией толстого кишечника. Достоверных различий по частоте обнаружения бактерий рода *Helicobacter* в обеих группах не выявлено.

Положительные в отношении бактерий рода *Helicobacter* образцы ДНК от 12 больных были последовательно протестированы с помощью видоспецифических праймеров *H. bilis*,

H. pullorum, *H. pylori* и *H. garrini*. В 7 случаях образцы были позитивными в отношении гена 23S рРНК *H. pylori* и столько же в отношении гена *ureB* *H. garrini*. При этом *H. pylori* выявлен в желчи 4 больных гепатобилиарной патологией (у 3 больных хроническим холециститом, у одного больного хроническим гепатитом невыясненной этиологии), а *H. garrini* у 5 (у 3 больных хроническим холециститом, у 2 – хроническим гепатитом, в том числе в одном случае, ассоциированном с вирусом гепатита С). Бактериальная микст-инфекция *H. pylori* + *H. garrini* обнаружена у 5 больных. Все образцы в отношении генов *cdtB* *H. pullorum* и *cdtB* *H. bilis* были негативными.

Полученные данные указывают на наличие колонизации билиарного тракта бактериями рода *Helicobacter* больных с различными заболеваниями желудочно-кишечного тракта, причём в большинстве случаев с внежелудочными поражениями – желчного пузыря, печени, поджелудочной железы и кишечника. По данным различных исследователей, различные виды этого рода обнаруживают в желчи, желчном пузыре и печени больных с патологией гепатобилиарной системы, но наиболее часто встречаются *H. pylori* и энтерогепатические хеликобактеры *H. bilis*, *H. pullorum*, *H. garrini*. В нашем исследовании у 38,09% больных с гепатобилиарной патологией были изолированы хеликобактеры, по видовой принадлежности отнесенные к *H. pylori* и *H. garrini*, при этом в половине случаев в виде микст-инфекции.

H. garrini – мезофильная грамотрицательная извитая палочка, впервые описанная R. Garrin в 1881 году. В 1970 году V.G. Lockard и соавторы опубликовали электронную микрофотографию биоптата слизистой желудка собаки. На ней была видна извитая бактерия с 10–20 биполярно расположенными жгутиками и периплазматическими волокнами, полностью охватывающими тело клетки [15]. Позднее Bryner J.H. и др. выделили эти бактерии из абортусов собак и первоначально назвали *Flexispira garrini* [2]. После анализа нуклеотидной последовательности 16S рРНК их включили в состав рода *Helicobacter*. Кроме того, было установлено, что *H. garrini* достаточно гетерогенен и представляет собой группу, состоящую приблизительно из 10 генетических вариантов [4]. Сообщения о выделении этих бактерий от больных гастроэнтеритами собак и кошек указывают на зоонозную природу поражений, вызываемых *H. garrini* [11; 17]. У иммунодефицитных пациентов бактерии способны вызывать бактериемии [3; 9]. В нашем исследовании у 7 больных (21,2%) была изолирована ДНК *H. garrini*, при этом у 5 инфицированных выявлена патология со стороны гепатобилиарной системы больных, что может указывать на возможное участие этой бактерии в патогенезе заболеваний билиарного тракта. В проведенном исследовании в 5 случаях была выявлена смешанная инфекция *H. pylori* и *H. garrini*, в одном – вируса гепатита С и *H. garrini*. При смешанном инфицировании возможно синергетическое действие

факторов патогенности микроорганизмов, что может способствовать усилению патогенетического воздействия на ЖКТ.

Однако если для энтерогепатических хеликобактеров желчный пузырь является привычной средой обитания, то для *H.pylori* желчь – агрессивная среда. Ингибирующее воздействие желчных кислот на *H.pylori* было продемонстрировано в работе M.L. Hanninen, где под действием хенодезоксихолевой и дезоксихолевой кислот (основных компонентов желчи) происходило разрушение этого микроорганизма *in vitro* [7]. Но бактериостатический эффект *in vitro* не может быть воспроизведен в той же степени *in vivo*. Исследования *in vivo* показывают обратную зависимость между концентрацией желчи и степенью обсемененности слизистой оболочки желудка *H.pylori* при гастроудоденальном рефлюксе [10]. Возможно, что *H.pylori* обладает адаптивными механизмами, которые защищают микроорганизм от агрессивного действия не только от кислотного окружения в желудке, но и от щелочной среды и желчных кислот в билиарном тракте. На это указывают результаты исследований о различной экспрессии вирулентных факторов при воздействии желчи на бактерии рода *Helicobacter*, которые могут способствовать сохранению их жизнеспособности в различных экологических нишах [8]. В проведенном исследовании ДНК *H.pylori* была обнаружена в желчи 21,2% больных с различной патологией ЖКТ, но преимущественно внежелудочной локализации (заболеваниями гепатобилиарной системы, поджелудочной железы и кишечника). Полученные нами результаты коррелируют с ранее проведенными исследованиями, и накопленные данные позволяют сделать первоначальные выводы о возможном участии *H.pylori* и энтерогепатических хеликобактеров в патогенезе заболеваний гепатобилиарной системы и кишечника. Но отсутствие достоверных статистических данных об инфицированности хеликобактерами в популяции здоровых людей без заболеваний желудочно-кишечного тракта заставляет с осторожностью относиться к полученным результатам. Отсутствие «золотого» стандарта диагностики бактерий рода *Helicobacter* в желчи также может оказывать сдерживающий эффект в исследованиях по изучению этиологической значимости этих бактерий в патогенезе заболеваний желудочно-кишечного тракта, преимущественно внежелудочной локализации. Несмотря на противоречивость мнений, это новое, быстро развивающееся направление молекулярной детекции бактерий рода *Helicobacter* можно отнести к весьма перспективному и требующему продолжения исследований в данной области.

Список литературы

1. Ananieva O., Nilsson I., Vorobjova T., Uibo R., Wadstrom T. Immune responses to bile-tolerant *Helicobacter* species in patients with chronic liver diseases, a randomized population group, and healthy blood donors. *Clin Diagn Lab Immunol.* 2002;9:1160–4.
2. Bryner J.H., Ritchie A.E., Pollet L. et al. Experimental infection and abortion of pregnant guinea pigs with a unique spirillum-like bacterium isolated from aborted ovine fetuses // *Am J Vet Res.* – 1987. – Vol. 48. – P. 91–97.
3. Cuccherini B., Chua K., Gill V. et al. Bacteremia and skin/bone infections in two patients with X-linked agammaglobulinemia caused by an unusual organism related to *Flexispira/ Helicobacter* species // *Clin Immunol.* – 2000. – Vol. 97. – P. 121–129.
4. Dewhirst F.E., Fox J.G., Mendes E.N. et al. *Flexispira rappini* strains represent at least ten *Helicobacter* taxa // *Int J Syst Bacteriol.* – 2000. – Vol. 50. – P. 1781–1787.
5. Fox J.G., Dewhirst F.E., Shen Z.L., et al. Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis // *Gastroenterology.* – 1998. – Vol. 114. – P. 755–763.
6. Hamada T., Yokota K., Ayada K. et al. Detection of *Helicobacter hepaticus* in human bile samples of patients with biliary disease // *Helicobacter.* – 2009. – Vol. 14. – P. 545–551.
7. Hanninen M.L. Sensivity of *Helicobacter pylori* to different bile salts // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 1991. – Vol. 10. – P. 515–518.
8. Hynes S.O., McGuire J., Wadström T. The effect of bile on protein expression by intestinal *Helicobacters*, determined using ProteinChip(r) Technology // *Gut.* – 2001. – Vol. 49 (Suppl. 2) – A67 (Abstract).
9. Iten A., Graf S., Egger M. et al. *Helicobacter* sp. *Flexispira* bacteremia in a immunocompetent young adult // *J. Clin. Microbiol.* – 2001. – Vol. 39(5). – P. 16–20.
10. Kawai Y., Tazuma S., Inoue M. Bile acid reflux and possible inhibition of *Helicobacter pylori* infection in subjects without gastric surgery // *Dig Dis Sci.* – 2001. – Vol. 46. – P. 1779–1783.
11. Kipar A., Weber M., Menger S. et al. Fatal gastroduodenal infection with «*Flexispira rappini*» – like organism in a cat // *J Vet Med B Infect Dis Vet Public Health.* – 2001. – Vol. 48(5). – P. 357–65.
12. Kobayashi T., Harada K., Miwa K., Nakanuma Y. *Helicobacter* genus DNA fragments are commonly detectable in bile from patients with extrahepatic biliary diseases and associated with their pathogenesis // *Dig Dis Sci.* – 2005. – Vol. 50. – P. 862–867.
13. Kosaka T., Tajima Y., Kuroki T. et al. *Helicobacter bilis* colonization of the biliary system in patients with pancreaticobiliary maljunction // *Br J Surg.* – 2010. – Vol. 97. – P. 544–549.

14. Lee J.-W., Lee D.H., Lee J.I. et al. Identification of *Helicobacter pylori* in Gallstone, Bile, and Other Hepatobiliary Tissues of Patients with Cholecystitis // *Gut Liver*. – 2010. – Vol. 4(1). – P. 60–67.
15. Lockard V.G., Boler R.K. Ultrastructure of a spiraled microorganism in the gastric mucosa of dogs // *Am J Vet Res*. – 1970. – Vol. 31. – P. 1453–1462.
16. Ménard A., Santos A., Mégraud F. et al. PCR-restriction fragment length polymorphism can also detect point mutation A2142C in the 23S rRNA gene, associated with *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin // *Antimicrob Agents Chemother*. – 2002. – Vol. 46. – P. 1156–1157.
17. Misawa N., Kawashima K., Kondo F. et al. Isolation and characterization *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Anaerobiospirillum* strains from a puppy with bloody diarrhea // *Vet Microbiol*. – 2002. – Vol. 87(4). – P. 353–364.
18. Nilsson I., Lindgren S., Eriksson S., Wadstrom T. Serum antibodies to *Helicobacter hepaticus* and *Helicobacter pylori* in patients with chronic liver disease // *Gut*. – 2000. – Vol. 46. – P. 410–414.
19. Pisani P., Whary M.T., Nilsson I., Sriamporn S., Wadström T., Fox J.G., Ljungh A., Forman D. Cross-reactivity between immune responses to *Helicobacter bilis* and *Helicobacter pylori* in a population in Thailand at high risk of developing cholangiocarcinoma // *Clin Vaccine Immunol*. – 2008. – Vol. 15. – P. 1363–1368.
20. Rocha M., Avenaud P., Menard A. et al. Association of *Helicobacter* species with hepatitis C cirrhosis with or without hepatocellular carcinoma // *Gut*. – 2005. – Vol. 54. – P. 396–401.
21. Vorobjova T., Nilsson I., Terjajev S., Granholm M., Lyyra M., Porkka T. et al. Serum antibodies to enterohepatic *Helicobacter* spp. in patients with chronic liver diseases and in a population with high prevalence of *H. pylori* infection // *Dig Liver Dis*. – 2006. – Vol. 38. – P. 171–176.

Авторы выражают признательность за техническую поддержку данного исследования ООО «Ассоциация Медицины и Аналитики» (г. Санкт-Петербург, Россия) и за методическую помощь профессору Ф. Мегро, секретарю Европейской группы по изучению Helicobacters и Campylobacters (г. Бордо, Франция).

Рецензенты:

1. Фролова О.А., д.м.н., профессор кафедры общей гигиены Казанской государственной медицинской академии, г. Казань.
2. Багаева Т.В., д.б.н., профессор кафедры физиологии и биохимии растений Казанского (Приволжского) федерального университета, г. Казань.