

УДК 616.98:579.835-07

ЭНТЕРОГЕПАТИЧЕСКИЕ ХЕЛИКОБАКТЕРЫ: СВОЙСТВА, МЕТОДЫ ДИАГНОСТИКИ

Исаева Г. Ш.

ООО «Лечебно-диагностический центр «Фарм-Т», Казань, Россия (420111, ул. Профсоюзная, 30/13), e-mail guisaeva@rambler.ru

Энтерогепатические виды рода *Helicobacter* представляют разнообразную группу микроорганизмов, которые были идентифицированы в желудочно-кишечном тракте человека, некоторых млекопитающих и птиц. В большинстве случаев они связаны с воспалением и злокачественной трансформацией у иммунокомпетентных хозяев и с более тяжелыми заболеваниями у иммунодепрессивных пациентов. Цель этого обзора: описание свойств энтерогепатических хеликобактеров, обсуждение их роли в патогенезе заболеваний желудочно-кишечного тракта и характеристика методов диагностики. Для детекции энтерогепатических хеликобактеров предложены микроскопические, бактериологические, серологические и молекулярно-генетические методы. Широкое внедрение культуральных методов, разработка коммерческих наборов мультимикротестов и антигенных диагностикомов может значительно облегчить идентификацию бактерий этого рода. «Золотым» стандартом детекции бактерий рода *Helicobacter* может служить полимеразно-цепная реакция и/или секвенирование.

Ключевые слова: энтерогепатические хеликобактеры, диагностика.

ENTEROHEPATIC HELICOBACTERS: PROPERTIES, METHODS OF DIAGNOSIS

Isaeva G. S.

Therapeutic and Diagnostic Center «Pharm-T» (Kazan, Russia) (420111, Kazan, Profsouznyaya street, 30/13) e-mail guisaeva@rambler.ru

Enterohepatic *Helicobacter* species are an equally diverse group of organisms which have been identified in the intestinal tract and the liver of humans, other mammals, and birds. In most cases they have been linked with the inflammation or the malignant transformation in immunocompetent hosts and with more severe clinical disease in immunocompromised patients. The purpose of this review is to describe properties of the enterohepatic *Helicobacter* species, to discuss their role in the pathogenesis of gastrointestinal and enterohepatic diseases, and to characterize the methods of their diagnosis. Microscopical, bacteriological, serological and molecular methods are proposed for the detection of enterohepatic helicobacters. The wide introduction of the cultural methods, the development of commercial kits multimicrotests and antigenic diagnosticum can greatly facilitate the identification of the bacteria of this generum. «Gold» standard for the detection of *Helicobacter*'s bacteria may be a chain – polymerase reaction and/or sequencing.

Key words: enterohepatic *Helicobacters*, diagnosis.

Энтерогепатические хеликобактеры составляют большую часть известных на сегодняшний день представителей рода *Helicobacter*. Эволюционно эти виды приобрели способность колонизировать слизистую оболочку кишечника, желчного пузыря, желчевыводящих путей, а также печень. Большинство энтерогепатических хеликобактеров уреазоотрицательные и толеранты к действию желчи, что отличает их от «желудочных» видов. Все известные виды этих бактерий колонизируют организм животных, но некоторые из них обнаружены у человека, из которых наиболее часто встречаются *H.cinaedi*, *H.fennelliae*, *H.bilis*, *H.pullorum*, *H.hepaticus*.

Впервые *H.cinaedi* и *H.fennelliae* были изолированы из ректальных мазков мужчин-гомосексуалистов, страдающих проктоколитами и энтеритами [6; 23]. Роль этих бактерий в патогенезе хронических воспалительных заболеваний кишечника еще мало изучена.

H.cinaedi и *H.fennelliae* могут вызывать бактериемии у пациентов с иммунодефицитами [14; 18]. Диагностика поражений, вызываемых *H.cinaedi*, *H.fennelliae*, включает бактериологический, бактериоскопический и молекулярный методы исследования. Материалом для исследования служат фекалии или биоптаты слизистой оболочки кишечника. Исследуемый материал транспортируют в 20 % глицерине. Фекальные массы гомогенизируют в физиологическом растворе и пропускают через фильтры с диаметром пор 0,45 мкм, что повышает избирательность роста и способствует более полному удалению контаминирующей микрофлоры, тормозящей рост хеликобактеров. Для более эффективного культивирования *H.cinaedi*, *H.fennelliae* требуется повышенное содержание не только углекислого газа, но и водорода (до 5–10 %), что может затруднять выделение этих бактерий из клинического материала в лабораториях, использующих стандартные газовые пакеты [16]. Посев фильтратов производят на питательные среды, обогащенные кровью и дополненные антибиотиками. Для микроскопии мазков-отпечатков предпочтительно применение люминесцентной микроскопии с окраской акридиновым оранжевым. Также эффективна темнопольная микроскопия нативных препаратов, приготовленных из гомогенатов. Эффективность ПЦР при исследовании испражнений может снижать наличие большого количества ингибиторов, хотя в последнее время предложены эффективные реактивы для извлечения ДНК хеликобактеров из фекалий [25]. Для постановки точного диагноза рекомендовано применение не менее двух диагностических методов, одним из которых должна быть ПЦР.

H.pullorum был изолирован из слепой кишки здоровых кур, а также из печени и кишечника кур, больных гепатитом. Известны случаи выделения *H.pullorum* от больных гастроэнтеритом, при этом в одном случае диарея сопровождалась повышением активности трансаминаз и гепатомегалией [3; 21]. Патогенез вызываемых поражений может быть связан с синтезом цитотоксина CDL (cytolethal distending toxin, цитолетальный «вспенивающий» токсин), сходный с токсинами других хеликобактеров [5]. На клеточных культурах гепатоцитов *in vitro* он вызывает нарушения структуры клетки и клеточного цикла, подобно бактериальным ДНК-азам [4].

Впервые бактерия *H.bilis* была выделена из печени, желчного пузыря, кишечника мышей с гепатитом и гепатомой [9]. Является нормальным представителем кишечника животных, но при определенных условиях может вызывать поражения, например, при попадании в несвойственные для нее биотопы – желчный пузырь и печень. На возможное участие бактерий в патологии человека указывают работы об обнаружении ДНК-последовательностей этого вида в желчи у больных хроническим холециститом [7]. В исследовании Kosaka и соавт. (2010) ДНК *H.bilis* была обнаружена у 70,6 % больных

панкреатобилиарными заболеваниями, что было достоверно выше, чем в контрольной группе (29,6 %). Авторы пришли к заключению, что длительная колонизация желчного эпителия *H.bilis* может привести к развитию билиарной карциномы [17].

H. hepaticus был открыт в 1992 году в ходе изучения природы аномально высокой частоты гепатоцеллюлярных карцином у мышей линии A/JSr [8]. Бактерии колонизируют кишечник мышей, но в некоторых случаях могут быть обнаружены в печени при хроническом гепатите. Возможное влияние половых гормонов на развитие гепатита, индуцированное *H.hepaticus*, было изучено на мышах линии A/JSr. За 4 месяца наблюдения кастрированные животные и самцы, получавшие антагонисты рецепторов к андрогену, имели менее выраженные изменения печени, чем в контроле [22]. Полученные результаты указывают на возможность использования гормональной терапии у мужчин с инфекционной гепатоцеллюлярной карциномой. *H.hepaticus* обнаруживают у больных с заболеваниями гепатобилиарной системы и кишечника. Культуральный, серологический и ПЦР-методы были использованы Namada T. и соавт. (2009) для детекции энтерогепатических хеликобактеров в желчи больных холециститом, холелитиазом, полипами желчного пузыря и в контрольной группе, при этом ДНК *H.hepaticus* была идентифицирована у 41 % больных желчекаменной болезнью и 36 % больных холециститом, что было достоверно чаще, чем в других группах (17 % с полипами и 13 % в контрольной группе) [13]. Для выделения *H.hepaticus* был использован метод мембранной фильтрации для исключения ингибирующего воздействия желчи, но культура не была выделена ни в одном случае. Морфологически в образцах желчи *H.hepaticus* имел форму кокковидных палочек, видовая принадлежность которых была подтверждена методом ДНК-гибридизации. Этими же авторами была изучена жизнеспособность тест-штамма *H.hepaticus* в желчи, которая резко снижалась после первого часа инкубирования и полностью прекращалась спустя пять часов.

Методами детекции энтерогепатических хеликобактеров являются микроскопические, молекулярно-генетические, серологические и бактериологические, но отсутствие диагностического стандарта может оказывать сдерживающий эффект в исследованиях по изучению этиологической значимости этих бактерий в патологии человека и животных. Сообщения об успешном выделении бактерий рода *Helicobacter* немногочисленны. Трудности бактериологического метода исследования могут быть обусловлены различными факторами. Возможно, что исследуемый материал содержит ингибиторы роста хеликобактеров, 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). Для устранения возможного содержания ингибиторов роста хеликобактеров в исследуемом материале рекомендовано использования метода мембранной фильтрации. Материал пропускают через бактериальные фильтры диаметром 47 mm с размером пор 0,45 μm с дальнейшим промыванием фильтров для устранения остатков материала фосфатно-солевым буфером с 0,1 % бычьей сывороткой. Далее фильтры наносят на поверхность питательных сред и культивируют. Большое значение для успешного культивирования может иметь газовая среда для создания микроаэрофильных условий. Shiohara M. и соавт. (2009) доложили о влиянии состава газовой смеси на размер колоний и морфологию тест-штамма *H.felis* (ATCC 49179) [20]. Они установили, что атмосфера культивирования, содержащая 12 % O_2 и 10 % CO_2 , является оптимальной для размера колоний, но влияет на морфологию бактерий, при этом количество кокковидных форм превалирует над спиралевидными, что может затруднять идентификацию. Ложно-отрицательные результаты также могут быть получены при несоблюдении длительности культивирования. Не нужно забывать, что энтерогепатические хеликобактеры отличаются от *H.pylori* более медленным ростом: длительность культивирования энтерогепатических хеликобактеров должна составлять две недели, в то время как для *H.pylori* – не более семи дней. 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 наборов мультимикротестов может значительно облегчить биохимическую идентификацию бактерий этого рода. Hoosain N., Lastovica A. J. (2009) изучили десять видов бактерий рода *Helicobacter* (42 штамма) с использованием Oxoid Biochemical Identification System Campy Test (ID0800M) отрицательных по L-аланинаминопептидазе. Основываясь на полученных данных, они подтвердили, что этот тест может быть использован для рутинной идентификации грамотрицательных L-аланинаминопептидаза отрицательных бактерий родов *Campylobacter*, *Arcobacter* и *Helicobacter* [14].

Специфической окраски для обнаружения хеликобактеров не существует. Несмотря на то, что все бактерии рода *Helicobacter* относятся к извитым, морфологически отличаются друг от друга размерами, количеством завитков, жгутиков, их расположением, наличием или отсутствием периплазматических волокон. Морфологическая диагностика обычно не вызывает затруднений у опытного гистолога, но в сомнительных случаях можно прибегнуть к иммуногисто- или цитохимической окраске с использованием специфических антител против поверхностных протеинов хеликобактеров. Переход бактерий из спиралевидной формы в кокковидную делает невозможной морфологическую идентификацию и требует

применения других подтверждающих методов, что ограничивает использование микроскопических методов.

Молекулярная биология является бесценным инструментом для идентификации микроорганизмов. «Золотым» стандартом детекции бактерий рода *Helicobacter* может служить полимеразно-цепная реакция и/или секвенирование. Идентификация, основанная на детекции гена 16S рДНК, является наиболее часто используемым методом, однако этот ген может быть недостаточно информативной мишенью вследствие горизонтального переноса фрагментов 16S рДНК и создания мозаичной молекулы с недостатком филогенетической информации. Другие филогенетически информативные гены, такие как 23S рДНК, могли бы быть использованы для видовой детекции, но недостаток информации о нуклеотидных последовательностях ограничивает их потенциальное применение в качестве мишени. Среди энтерогепатических хеликобактеров только геном *H. hepaticus* полностью расшифрован. Но эта ситуация понемногу исправляется, т.к. работы по секвенированию продолжаются, в частности для *H. bilis*, *H. canadensis*, *H. cinaedi*, *H. pullorum*, *H. winghamensis*. Хотя окончательная сборка геномов еще не закончена, но предварительные данные уже доступны в базе данных микробных геномов NCBI. Другой проблемой молекулярно-генетического метода детекции энтерогепатических хеликобактеров являются ингибиторы ПЦР, содержащиеся в исследуемом материале (фекалиях, желчи и т.п.). Мюаерт Н. и соавт. (2008) провели сравнительное изучение ПЦР, основанной на детекции гена 16S рДНК в фекалиях, и продемонстрировали, что пять из шести методов способны элиминировать ингибиторы реакции [19]. Наиболее эффективным был признан метод ПЦР с дифференцированным градиентом геля для электрофореза, рекомендованный ранее [1]. Значительное повышение чувствительности ПЦР для детекции энтерогепатических хеликобактеров может быть достигнуто после введения в практику ПЦР в реальном времени (real-time PCR). В частности, Gonzalez А. и соавт. (2008) доложили о разработанной методике ПЦР в реальном времени для идентификации *H. pullorum* в куриных продуктах, которая позволяет амплифицировать видоспецифический фрагмент 16S рДНК с детекцией апликонов с помощью SYBR Green I [11]. Этот метод позволяет идентифицировать ДНК бактерии в мясе птицы и их кишечнике с чувствительностью 1 CFU/g. Он подтвердил неадекватность результатов (ложно-отрицательные результаты) при использовании культурального метода по выделению этих бактерий и показал, что частота инфицирования здоровых кур *H. pullorum* сходна с распространенностью инфекции *Campylobacter jejuni*. Эти данные коррелируют с результатами, полученными ранее, указывающими на зоонозное происхождение инфекции *H. pullorum* [2]. Своевременная диагностика *H. pullorum* в продуктах питания позволит

снизить потенциальные риски для человека, вызываемые инфицированием данным микроорганизмом.

Для диагностики энтерогепатических хеликобактеров предложены серологические методы исследования. Специфичность и чувствительность зависит от происхождения антигенов, т.к. присутствие перекрестно-реагирующих антигенов, особенно жгутиковых, у различных видов хеликобактеров, стимулировало создание высоко очищенных антигенов. В связи с тем, что практически все виды бактерий рода *Helicobacter* встречаются у животных, в разработке новых высоко чувствительных тестов по их обнаружению принимают участие и ветеринарные службы. Разработана международная программа «Performance Evaluation program» для облегчения мониторинга патогенных микроорганизмов в ветеринарных диагностических лабораториях, первые успешные результаты этой программы уже представлены для многих патогенов, включая бактерии рода *Helicobacter* [12]. Например, новый иммуоблот-тест разработан для мониторинга инфекции *H.bilis*, *H.hepaticus*, *H.ganmani* у лабораторных грызунов [24]. Y. Fukuda и соавт. (2009) доложили об успешном испытании нового антигена *H.hepaticus* для теста ELISA с использованием моноклональных антител, приготовленных из сывороток лабораторных мышей, с чувствительностью 87 % и специфичностью 97,6 % [10]. Таким образом, апробирование диагностических методик на животных значительно облегчает и ускоряет их внедрение для диагностики у людей.

Заключение. Интенсивные исследования по изучению роли энтерогепатических хеликобактеров в патогенезе заболеваний человека и животных позволяют сделать первоначальные выводы об их возможном участии в этих процессах. Несмотря на противоречивость мнений, это новое быстро развивающееся направление можно отнести к весьма перспективному и требующему продолжения исследований в данной области.

Список литературы

1. Al-Soud W. A., Bennedsen M., On S. L., Ouis I.S., Vandamme P., Nilsson H. O., Ljungh A., Wadström T. Assessment of PCR-DGGE for the identification of diverse *Helicobacter* species, and application to faecal samples from zoo animals to determine *Helicobacter* prevalence. // J Med Microbiol. – 2003. – Vol. 52 (Pt 9). – P. 765-771.
2. Atabay H. I., Corry J. E., On S. L. Identification of unusual *Campylobacter*-like isolates from poultry products as *Helicobacter pullorum* // J Appl Microbiol. – 1998. – Vol. 84(6). – P.1017-1024.
3. Burnens A. P., Stanley J., Morgenstern R. et al. Gastroenteritis associated with *Helicobacter pullorum* // Lancet. – 1994. – Vol. 344. – P. 1569–1570.

4. Ceelen L. M., Haesenbrouck F., D'Herde K. et al. Mitotic catastrophe as a prestage to necrosis in mouse liver cells treated with *Helicobacter pullorum* sonicates // J Microbiol. – 2009. – Vol. 270. – P. 921-928.
5. Chien C. C., Taylor N. S, Ge Z. et al. Identification of cdtB homologues and cytolethal distending toxin activity in enterohepatic *Helicobacter* spp. // J Med. Microbiol. – 2000. – Vol. 49. – P. 525-534.
6. Fennell C. L., Totten P. A., Quinn T. C. et al. Characterization of *Campylobacter*-like organisms isolated from homosexual men // J. Infect. Dis. – 1984. – Vol.149. – P.58-66.
7. Fox J. G., Dewhirst F. E., Shen Z. et al. Hepatic *Helicobacter* species identified in bile and gallbladder tissue from Chileans with chronic cholecystitis // Gastroenterology. – 1998. – Vol. 114. – P.755–763.
8. Fox J. G., Dewhirst F. E., Tully J. G. et al. *Helicobacter hepaticus* sp. nov., a microaerophilic bacterium isolated from livers and intestinal mucosal scrapings from mice // J Clin. Microbiol. – 1994. – Vol. 32. – P.1238-1245.
9. Fox J. G., Yan L. L., Dewhirst E. et al. *Helicobacter bilis* sp.nov., a novel *Helicobacter* species isolated from bile, livers, and intestines of aged, inbred mice // J Clin. Microbiol. – 1995. – Vol.33. – P.445-454.
10. Fukuda Y., Shimoyama T., Ohmura T. et al. Characterization and application of a new monoclonal antibody with high specificity for *Helicobacter hepaticus* // Helicobacter. – 2009. – Vol. 14(1). – P. 66-71.
11. González A., Piqueres P., Moreno Y., Cañigral I., Owen R.J., Hernández J., Ferrús M. A. A novel real-time PCR assay for the detection of *Helicobacter pullorum*-like organisms in chicken products // Int Microbiol. – 2008. – P. 203-208.
12. Goto K., Goto K., Hayashimoto N., Ishida T., Takakura A., Kagiya N. First trial in the developmental phase of the "performance evaluation program" based on the ICLAS animal quality network program: self-assessment of microbiological monitoring methods using test samples supplied by ICLAS // Exp. Anim. – 2009. – Vol. 58 (1). – P.47-52.
13. 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.
14. Hoosain N., Lastovica A. J. An evaluation of the Oxoid Biochemical Identification System Campy rapid screening test for *Campylobacteriaceae* and *Helicobacter* spp. //Lett Appl Microbiol – 2009. – Vol. 48. – P.675-9.
15. Hsueh P.-R., Teng L. J., Hung C.-C. et al. Septic shock due to *Helicobacter fennelliae* in non-human immunodeficiency virus-infected heterosexual patient // J Clin. Microbiol. – 1999. – Vol. 37. – P.2084–2086.

16. Kiehlbauch J.A., Brenner D.J., Cameron D.N. et al. Genotypic and phenotypic characterization of *H cinaedi* and *H fennelliae* strains isolated from humans and animals // J Clin. Microbiol. – 1995. – Vol.22. – P.2940–2947.
17. 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.
18. Mammen M. P. Jr., Aronson N. E., Edenfield W. J. Recurrent *Helicobacter cinaedi* bacteremia in a patient infected with human immunodeficiency virus: case report // Clin. Infect Dis. – 1995. – Vol. 21. – P.1055.
19. Moyaert H., Pasmans F., Ducatelle R., Haesebrouck F., Baele M. Evaluation of *16S rRNA* gene-based PCR assays for genus-level identification of *Helicobacter* species // J Clin. Microbiol. – 2008. – Vol.46 (5). – P.1867-1869.
20. Shiohara M., Kawakubo M., Matsumoto T. et al. Laboratory appraisal of optimal gaseous conditions for growth of zoonotic *Helicobacter felis* ATCC 49179 // Microbiol Immunol. – 2009. – Vol.53. – P.251-258.
21. Steinbrueckner B., Haerter G., Pelz K. et al. Isolation of *Helicobacter pullorum* from patients with enteritis // Scand J Infect Dis. – 1997. – Vol. 29. – P.315–318.
22. Theve E. J., Feng Y., Taghizadeh K., Cormier K. S., Bell D. R., Fox J. G., Rogers A. B. Sex hormone influence on hepatitis in young male A/JCr mice infected with *Helicobacter hepaticus*. // Infect Immun. – 2008. – Vol.76 (9). – P.4071-4078.
23. Totten P. A., Fennell C. L., Tenover F. C. *Campylobacter cinaedi* (sp.nov.) and *Campylobacter fennellae* (sp.nov.): two new *Campylobacter* species associated with enteric disease in homosexual men // J. Infect. Dis. – 1985. – Vol.151. – P.131-139.
24. Wadström T., Hau J., Nilsson I., Ljungh A. Immunoblot analysis as an alternative method to diagnose enterohepatic *Helicobacter* infections // Helicobacter. – 2009. – Vol.14 (3). – P.172-176.
25. Whary M.T., Cline J.H., King A.E. et al. Monitoring sentinel mice for *Helicobacter hepaticus*, *H rodentium* and *H bilis* infection by PCR and serology // Comp Med. – 2000. – Vol. 50. – P.436–443.

Рецензенты:

Фазылов Вильдан Хайруллаевич, д.м.н., профессор, зав. кафедрой инфекционных болезней ГБОУ ВПО «Казанский государственный медицинский университет», г. Казань.

Шарипова Маргарита Рашидовна, д.б.н., профессор кафедры микробиологии Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) федерального университета, Министерство образования РФ, г. Казань.