МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ
ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ
імені М. І. Пирогова

НОВИЦЬКИЙ АНДРІЙ ОЛЕКСАНДРОВИЧ

УДК 576.807:579.84: 616.98

ОПТИМІЗАЦІЯ МІКРОБІОЛОГІЧНОГО ВИЯВЛЕННЯ HELICOBACTER PYLORI

03.00.07 - мікробіологія

Автореферат
дисертації на здобуття наукового ступеня
кандидата медичних наук

Вінниця – 2015

Дисертацією є рукопис.
Робота виконана у Вінницькому національному аграрному університеті Міністерства освіти і науки України.

Науковий керівник: доктор біологічних наук, професор **Власенко Володимир Васильович**, Вінницький національний аграрний університет Міністерства освіти і науки України, завідувач кафедри харчових технологій та мікробіології.

Офіційні опоненти: доктор медичних наук, професор **Ковальчук Валентин Петрович**, Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова МОЗ України, професор кафедри мікробіології, вірусології та імунології;

доктор медичних наук, професор **Сидорчук Ігор Йосипович**, Буковинський державний медичний університет МОЗ України, професор кафедри мікробіології, вірусології та імунології.

Захист відбудеться 2 червня 2015 р. о 10-00 годині на засіданні спеціалізованої вченої ради К. 05.600.05 Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова, 21018, вул. Пирогова 56, м. Вінниця.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова МОЗ України за адресою: 21018, вул. Пирогова 56, м. Вінниця.

Автореферат розісланий 28 квітня 2015 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат медичних наук О. А. Назарчук

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми. Хвороби органів травлення займають одне з провідних місць, як за частотою інвалідизації, так і за показником смертності. Превалююче місце в структурі цієї захворюваності займають хронічні гастрити та виразкова хвороба. Провідне значення у виникненні і рецидивуванні понад 80 % усіх виразок дванадцятипалої кишки і 60 % усіх виразок шлунку, хронічних гастродуоденітів має Helicobacter pylori (H. pylori) (Харченко Н. В., 2007, Лапина Т. Л., 2010, Tytgat G., 2011). В Україні кількість хворих на пептичну виразку перевищило чотири мільйони чоловік. Інфікованість дорослого населення H. pylori сягає 80 % (Колесник П. О., 2008, Рапопорт С. И., 2008, Шептулин А. А., 2010 та ін.). За сучасними рекомендаціями виявлення H. pylori повинне бути комплексним і включати як мінімум 2 тести (M. L. Hutton et al, 2011).

Через вибагливий характер властивостей H. pylori для досягнення задовільних результатів культивування необхідно додавати до поживних середовищ кров, сироватку. Проте, ростові добавки можуть викликати розбіжності в результатах дослідів. Серед інших недоліків – робота з небезпечними біологічними рідинами, різна здатність цих добавок стимулювати утворення колоній, відсутність забезпечення росту всіх штамів, нестандартність виготовлення середовищ та вимоги до зберігання (Исаков В. А., Домарадский И. В., 2003 та ін.).

Зв’язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Дисертація є фрагментом комплексної наукової роботи кафедри харчових технологій та мікробіології Вінницького національного аграрного університету «Оптимізація мікробіологічного виявлення бактерій роду Helicobacter у тварин та людини» (державна реєстрація № 0113U004975). Дисертант є співвиконавцем даної теми.

Мета дослідження: оптимізувати мікробіологічні методи виявлення H. pylori на основі застосування нових рецептур поживних середовищ; визначити основні морфологічні, культуральні, біологічні особливості виділеного збудника.

Для досягнення поставленої мети були сформульовані наступні **завдання**:

- дослідити мікробіологічну характеристику H. pylori, частоту їх персистенції на слизовій оболонці гастродуоденальної ділянки хворих на гастродуоденіти та виразкову хворобу;
- розробити поживне середовище для оптимізації бактеріологічної діагностики хелікобактеріозу;
- розробити спосіб і діагностичний реагент для виявлення H. pylori в осіб з шлунково-кишковими захворюваннями;
- визначити ефективність запропонованих методів діагностики;
- розробити антихелікобактерний засіб для ерадикаційної терапії.

Об'єкт дослідження: процес мікробіологічної діагностики інфекції, викликаної H. pylori у хворих на виразкову хворобу шлунка, дванадцятипалої кишки, гастродуоденіт.

Предмет дослідження: частота вилучення, концентрація H. pylori у слизових оболонках гастродуоденальної ділянки; уреазна активність; морфологічні, культуральні, біохімічні, біологічні властивості H. pylori, чутливість до антибіотиків.

Методи досліджень: мікробіологічні – ідентифікація культур, оцінка морфологічних, культуральних, тинкторіальних ознак виділених хелікобактерів, визначення ступеня їх токсигенності, резистентності до антибіотиків; загально-клінічні; ендоскопічний із взяттям матеріалу для бактеріологічного та гістологічного досліджень, біохімічні, морфологічні, математико-статистичні методи.

Наукова новизна одержаних результатів. Розроблено нове поживне середовище для виділення H. pylori з покращеними ростовими якостями; вперше доведено, що на запропонованому поживному середовищі не виникають зміни токсигенних властивостей H. pylori стосовно токсинів CagA та VacA. Вперше розроблено метод одночасної реєстрації pH слизової оболонки шлунка і наявності в ній H. pylori, що дозволяє оптимізувати мікробіологічну діагностику H. pylori - інфекції. Удосконалено існуючі поживні середовища для мікробіологічного дослідження H. pylori; вперше доведено недоцільність використання більше двох ростових добавок для покращення росту хелікобактерій.

Вперше розроблено антимікробний лікарський засіб для лікування виразкової хвороби шлунку та дванадцятипалої кишки, асоційованих з H. pylori на основі синергічної дії комбінації антимікробних препаратів та комплексу речовин.

Наукову новизну одержаних результатів підтверджена патентами України на корисну модель: «Спосіб виявлення Helicobacter pylori при шлунково-кишкових захворюваннях» (Патент № 85459 від 25.11.2013. Бюл. № 22, заявка № u201304453 від 09.04.2013); «Поживне середовище для виявлення Helicobacter pylori при шлунково-кишкових захворюваннях» (Патент № 88360 від 11.03.2014. Бюл № 5, заявка № u201312318 від 21.10.2013); «Засіб для лікування виразкової хвороби шлунка та дванадцятипалої кишки, асоційованих з Helicobacter pylori» (Патент № 92250 від 11.08.2014. Бюл. № 15, заявка № u201401763 від 24.02.2014).

Практичне значення одержаних результатів. Обговорена доцільність застосування оригінального поживного середовища для виділення H. pylori, що не містить крові, її компонентів. Одержані результати дозволяють обґрунтовано використовувати новий тест для детекції H. pylori, в якому поєднується одночасне визначення pH слизової шлунка, оптимізується виявлення H. pylori і діагностика гастро-дуоденальної патології.

Розроблено антимікробний засіб для ефективної терапії хелікобактер асоційованих захворювань та обґрунтовано його застосування.

Результати досліджень дисертаційної роботи використовуються в навчальному процесі на кафедрі харчових технологій та мікробіології Вінницького національного аграрного університету; кафедрі мікробіології, вірусології та імунології Вінницького національного медичного університету імені М.І. Пирогова; структурних підрозділах Вінницької центральної районної клінічної лікарні, про що свідчать акти впроваджень. Дослідження обґрунтовують перспективність використання патентів України для оптимізації діагностики, лікування шлунково-кишкових інфекційних захворювань.

Особистий внесок здобувача. Представлені в роботі матеріали та фактичні дані є самостійним внеском автора, який самостійно визначив мету і завдання, вивчив та проаналізував літературу за темою дослідження, провів патентно-інформаційний пошук, особисто провів відбір і формування груп хворих. Особисто

виконав експериментальну та практичну частини роботи: зокрема мікробіологічні дослідження, визначення біологічних властивостей штамів H. pylori, чутливості до антибактеріальних препаратів, визначення уреазної активності біоптатів слизової шлунка і дванадцятипалої кишки. Брав участь у розробці композиції запропонованих поживного середовища та реагенту, їх апробації; брав участь в розробці композиції антихелікобактерного засобу, дослідженні його ефективності. Самостійно виконав ендоскопічні дослідження з верифікацією діагнозу на всіх етапах спостереження (забір матеріалу для бактеріологічного, біохімічного досліджень, полімеразної ланцюгової реакції); підготував бази даних та провів статистичну обробку; інтерпретував отримані результати; написав і оформив усі розділи дисертації, висновки, практичні рекомендації.

Автор висловлює подяку персоналу бактеріологічної лабораторії Вінницької районної СЕС за допомогу в проведенні етапів дослідження та лабораторії «Меділабс» (м. Вінниця) за проведення полімеразної ланцюгової реакції.

Апробація результатів дисертації. Основні положення дисертації викладено на: XV з`їзді Українського науково-медичного товариства мікробіологів, епідеміологів та паразитологів імені Д.К. Заболотного (Харків, 2011), конференції «Молоді вчені у вирішенні проблем виробництва і переробки продуктів тваринництва» (Вінниця, 2011), науково-практичній конференції «Актуальні питання стратегії, тактики застосування та дослідження антибіотиків, антисептиків та дезінфектантів» (Вінниця, 2012, 2014), III-му конгресі Європейських мікробіологів FEMS (Лейпциг, 21-25 липня 2013), щорічній 10-й науково-практичній конференції з міжнародною участю приуроченої до Дня науки «Сучасні проблеми епідеміології, мікробіології, гігієни та туберкульозу» (Львів, 2013), XIII з`їзді товариства мікробіологів України імені С.М. Виноградського (Ялта, 1-6 жовтня, 2013).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 14 наукових праць, із них 6 статей – у фахових наукових журналах і збірниках, рекомендованих ДАК України, 5 тез у збірниках науково-практичних конференцій, з`їздів, одержано 3 патенти України на корисну модель.

Структура та обсяг дисертації. Дисертація викладена українською мовою на 156 сторінках комп'ютерного друку і містить вступ, огляд літератури, розділ матеріалів і методів досліджень, 3 розділи власних досліджень, аналіз та узагальнення одержаних результатів, висновки, практичні рекомендації щодо практичного впровадження та додаток. Дисертація ілюстрована 20 таблицями і 15 рисунками. Список використаних джерел містить 255 посилань (101 кирилицею і 154 латиницею).

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтовано актуальність проблеми, визначені мета, завдання, об`єкти і предмети дослідження, сформульовано наукову новизну, розкрито теоретичне і практичне значення роботи, визначено особистий внесок автора, наведені дані про апробацію отриманих результатів.

В огляді літератури представлено сучасні принципи, методи діагностики хелікобактерної інфекції, охарактеризовано морфологію, метаболізм, епідеміологію H. pylori, наведено дані про резистентність цього збудника до антибіотиків.

Матеріали та методи досліджень. Для досягнення мети дисертаційної роботи і вирішення поставлених задач, використовували сучасні мікроскопічний, культуральний, біохімічний, статистичний методи. Для мікробіологічного дослідження використовували біоптати слизової тіла та антрального відділу шлунка, цибулини дванадцятипалої кишки (ДПК) та периульцерозних зон від 126 хворих на гастродуоденіти та виразкову хворобу шлунка і ДПК. Хворі перебували на амбулаторному та стаціонарному лікуванні у поліклінічному, терапевтичному та хірургічному відділеннях клінічної лікарні. Із них страждали на ерозивний гастродуоденіт 34 хворих. У 42 хворих виявлено гіпертрофічний, поверхневий, атрофічний та інші гастродуоденіти, які були об`єднані в окрему групу. У 27 пацієнтів виявлено активну виразку шлунка або ДПК, у 23 пацієнтів – загострення виразкової хвороби шлунка або ДПК протікало без поновлення дефектів слизової – були виявлені рубці, деформація шлунка або ДПК. Дослідження властивостей антимікробних засобів проводили на 78 штамах H. pylori.

Результати досліджень та їх обговорення. Результати власних досліджень викладено у трьох розділах. Усі виділені штами H. pylori мали характерні морфологічні, культуральні та біохімічні властивості. 36 штамів (46,2%) мали гемолітичні властивості. При цьому частота наявності гемолізинів у хелікобактерів, виділених у пацієнтів з дефектами слизової гастродуоденальної ділянки (ГДД), становила 58,5% випадків, а у пацієнтів без дефектів слизових – 20,0% ($p<0,01$).

Встановлено вірогідну різницю ($p<0,001$) за частотою виділення хелікобактерів у пацієнтів з ерозіями чи виразками слизової оболонки (86,9%) та із захворюваннями без дефектів слизової (38,5%). Виділення H. pylori також залежало від відділу ГДД, з якого брали біопсію. Так, частіше хелікобактери культивували з тіла та антрального відділу шлунка (при захворюваннях з дефектами слизових – на рівні 85,3%; при інших станах в межах від 18,8% до 58,0%). Встановлено, що H. pylori виділяли з усіх відділів шлунка і ДПК в середній концентрації (5,79±1,34) lg КУО/г біоптату без достовірної різниці між відділами ГДД.

Усі штами H. pylori, отримані під час досліджень, мали типові морфологічні, культуральні, біохімічні та гемолітичні властивості.

При дослідженні хелікобактерів на чутливість до антибіотиків, виявлено чутливість на рівні 42,3-98,7% (табл.1).

Уреазну активність біоптатів, що були взяті із слизових з дефектами (ерозії, виразки), виявили у 72,8% випадків. Вона була високою (в межах першої години після постановки тесту) у 70,5% хворих з дефектами слизових і лише у 10,6% хворих без дефектів слизової. Уреазний тест у біоптатів, що були взяті зі слизових без дефектів, був позитивним лише у 36,5% біоптатів ($p<0,05$).

Як видно з таблиці 1, найвищу чутливість H. pylori спостерігали до левоміцетину, тетрацикліну та офлоксацину. Найнижчою чутливість була до метронідазолу та фуразолідону.

Таблиця 1

Чутливість штамів H. pylori до антибактеріальних препаратів, що використовували для ерадикації

Назва препарату	Кількість чутливих та помірно-стійких штамів H. pylori		Середні значення діаметрів зон затримки росту, мм (M±m)
	абс. число	питома вага (%)	
Амоксицилін	70	89,7	24,1±2,7
Кларитроміцин	65	83,3	22,8±1,8
Метронідазол	33	42,3	*
Тетрациклін	74	94,9	27,6±4,2
Фуразолідон	64	82,1	26,7±3,0
Левоміцетин	77	98,7	28,4±4,1
Офлоксацин	73	93,6	24,8±4,1

Примітка. * - мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) < 8 мкг/мл

Виявлено, що із всіх досліджених штамів H. pylori, 50 штамів (64,1%) виявили чутливість до всіх препаратів, 14 штамів (17,9%) – до одного з препаратів, вісім штамів (10,3%) – до двох препаратів, чотири штами (7,6%) – до трьох препаратів. Найчастіше резистентність H. pylori до амоксициліну поєднувалась з резистентністю до метронідазолу (п`ять штамів), а шість штамів проявляли поєднану стійкість до метронідазолу з кларитроміцином. Ці дані узгоджуються з іншими літературними спостереженнями.

З огляду на високу захворюваність, тимчасову та стійку втрату працездатності в Україні виразкова хвороба шлунка і ДПК є важливою медико-соціальною проблемою, і надійний тест для виявлення H. pylori має вирішальне значення.

У третьому розділі провели порівняння бактеріологічного методу виявлення H. pylori з іншими (швидкий уреазний тест (ШУТ), стул-тест, дихальний уреазний тест (ДУТ)).

Дослідження виконано у 74 амбулаторних хворих з диспепсичними явищами, які проходили діагностичну ендоскопію верхніх відділів ШКТ з біопсією слизової шлунка. Для кожного методу були розраховані чутливість, специфічність, позитивні і негативні прогностичні значення, точність.

Хворих вважали інфікованими H. pylori, коли три і більше методів дали позитивний результат, і не інфікованими, коли 3 і більше методів дали негативний результат. Ендоскопічна картина була нормальною у 14,9% і патологічною у 85,1%. Хелікобактеріоз виявили загалом у 67,6% пацієнтів.

Найвищу специфічність отримали при використанні мікробіологічного (100%) і гістологічного (100%) методів; швидкого уреазного тесту (91,7%), дихального уреазного тесту (87,5%) і стул-тесту (79,2%). Найвищу чутливість мав швидкий уреазний тест (96%), далі: стул-тест (93,75%), дихальний уреазний тест (92%), гістологічний (90%) і культивування (86,0%).

У четвертому розділі подано досліди з розробки поживного середовища для виявлення H. pylori, без інгредієнтів крові, її похідних. Відповідно до

вищезазначеного поживне середовище містило сухий ферментативний пептон, агар-агар, воду та суху адаптовану молочну суміш із залізом (Nutrilon) при такому співвідношенні, мас.%: агар-агар 1-2, сухий ферментативний пептон 8-12, Nutrilon 1-3, вода – решта.

Концентрація поживних речовин у 100 мл поживного середовища: лінолева кислота – 26,7 – 80,1 мг, альфа-ліноленова кислота – 4,71 – 14,13 мг, залізо – 0,08 – 0,24 мг. Для виділення хелікобактера готували середовище. При цьому у нього додавали селективну добавку для пригнічення росту супутньої флори: ванкоміцин (2,5 мг/мл), налідиксова кислота (2,5 мг/мл) і амфотерицин В (0,25 мг/мл) з подальшим культивуванням.

Практичне дослідження запропонованих концентрацій інгредієнтів поживного середовища проводили в трьох дослідних серіях з мінімальним, проміжним і максимальним вмістом складових у межах означених вище концентрацій. Ріст штамів хелікобактерів на контрольному (агар Мюллера-Хінтона з 5% овечою кров`ю) і дослідному поживних середовищах спостерігали на 3 – 7 добу (табл. 2).

Таблиця 2

Результати культивування штамів H. pylori на контрольному та дослідному середовищах

Штами H. pylori	Кількість посівів (n)	Термін виявлення H. pylori (M±m, год)		p
		контроль	дослідне середовище	
H. pylori № 2	30	72±12	72±7	>0,05
H. pylori № 3	35	72±8	72±5	>0,05
H. pylori № 4	35	72±3	48±6	<0,05
H. pylori № 8	35	96±10	72±5	<0,05

Запропоноване поживне середовище не поступалось контрольному щодо швидкості росту збудника хелікобактеріозу, а інколи і переважало його, а концентрація інгредієнтів заявлених до складу середовища в мінімальних і максимальних концентраціях на швидкість ростових якостей суттєво не впливала.

H. pylori на запропоновану поживному середовищі утворювали характерні мілкі, напівпрозорі, блискучі, округлі колонії у вигляді «крапель роси».

Результати визначення індексу чутливості запропонованого середовища у відношенні хелікобактерів представлені в таблиці 3.

Індекс чутливості середовища по відношенню до штамів збудника хелікобактеріозу коливався в межах від 93,4% до 96,3%. Середній індекс для всіх штамів склав 94,95%.

Вірогідної різниці між контрольним і дослідним середовищами стосовно індексу чутливості не було виявлено. Таким чином, на запропонованому середовищі виявляли в середньому 94,95% бактеріальних клітин, що можна вважати цілком гарним результатом культивування хелікобактерів.

Мікроскопія мазків з культур фарбованих за Грамом показала, що всі дослідні штами H. pylori, які виросли на середовищі, характеризували як грамнегативні вигнуті палички (рис. 1).

Таблиця 3

Індекс чутливості запропонованого середовища у відношенні хелікобактерів

Штами H. pylori	Середня кількість колоній H. pylori (M ± m)		p
	контрольне середовище	дослідне середовище	
штам H. pylori №5, (n=3)	80±1,2	76±0,93	>0,05
штам H. pylori №11, (n=3)	81±2,1	76±1,1	
штам H. pylori №12, (n=3)	81±1,03	78±0,89	
штам H. pylori №13, (n=3)	82±1,6	78±1,0	

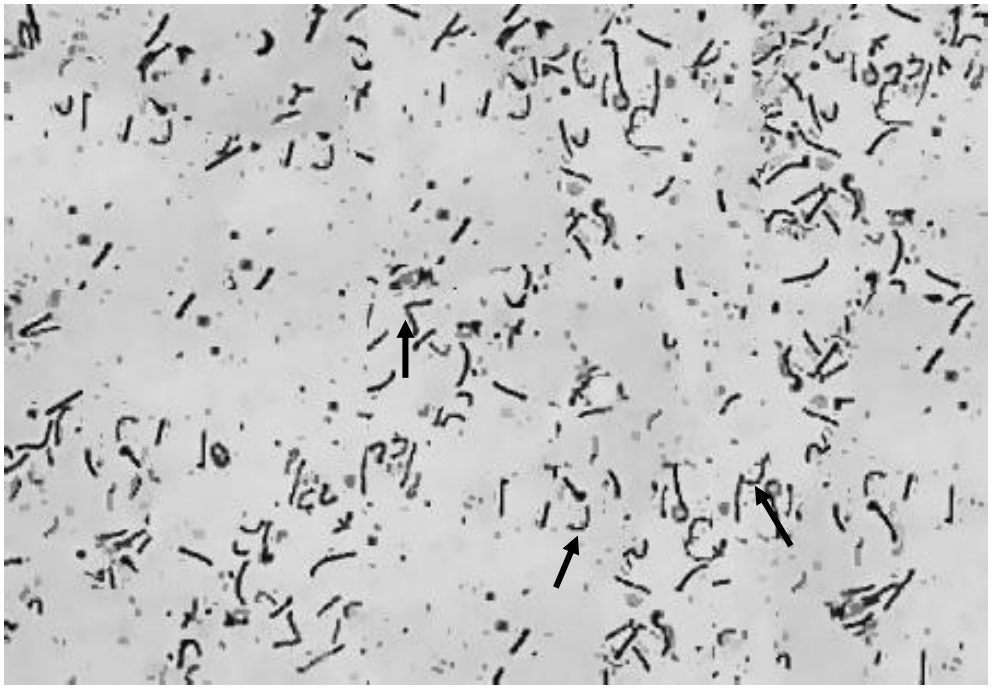

Рис. 1. Морфологія H. pylori, вирощених на дослідному середовищі через 48 год. Фарбування за методом Грама. Збільшення 900х.

В подальшому проводили вивчення токсигенних властивостей хелікобактерів, вирощених на запропонованому середовищі. Для цього було проведено методом полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР) визначення токсинів CagA та VacA клінічних штамів H. pylori. Дослідження проведено на 46 виділених штамах H. pylori (табл. 4).

Дослідження показали, що при рості на запропонованому середовищі токсигеність H. pylori (токсини VacA та CagA) достовірно не змінилась ($p > 0,05$). Проведено порівняння з існуючими запропонованого поживного середовища для виділення чистої культури H. pylori. В дослідах використовували колумбійський бульйон (КБ) і агар (КА), Brucella-бульйон (ББ) і агар (БА), бульйон Мюллер-Хінтона (БМХ) і агар (АМХ) виробництва Bio Merieux (Франція) і рідке та агаризоване запропоноване середовище (ЗС). До цих основ додавали 5% кінської

сироватки (КС), 5% ембріональної телячої сироватки (ЕТС), 5% дефібринованої кінської крові (КК), 1% дріжджового екстракту (ДЕ), 2% глутаміну (ГЛ).

Таблиця 4

Кількісна характеристика токсигенних штамів H. pylori, виділених від пацієнтів

Спосіб ідентифікації	Токсигенні штами H. pylori				Нетоксигенні штами H. pylori
	CagA+ VacA+	CagA+ VacA-	CagA- VacA+	Усього	CagA- VacA-
З біоптатів	17	8	6	31	15
З колоній на поживному середовищі	16	8	5	29	14
p	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

При дослідженні H. pylori у рідких середовищах з добавками встановлено, що додавання одного стимулятора, крім крові, до бульйонів покращувало ріст H. pylori в порівнянні з ними без добавок.

Різницю виявили в рості штамів при використанні різних стимуляторів (рис. 2, табл. 5). Так, найкращий ріст колоній отримали при додаванні кінської крові. Дещо гірші ростові характеристики мали кінська сироватка та екстракт дріжджів. Найнижчий рівень ростових властивостей демонстрували екстракт телячої сироватки та глутамін.

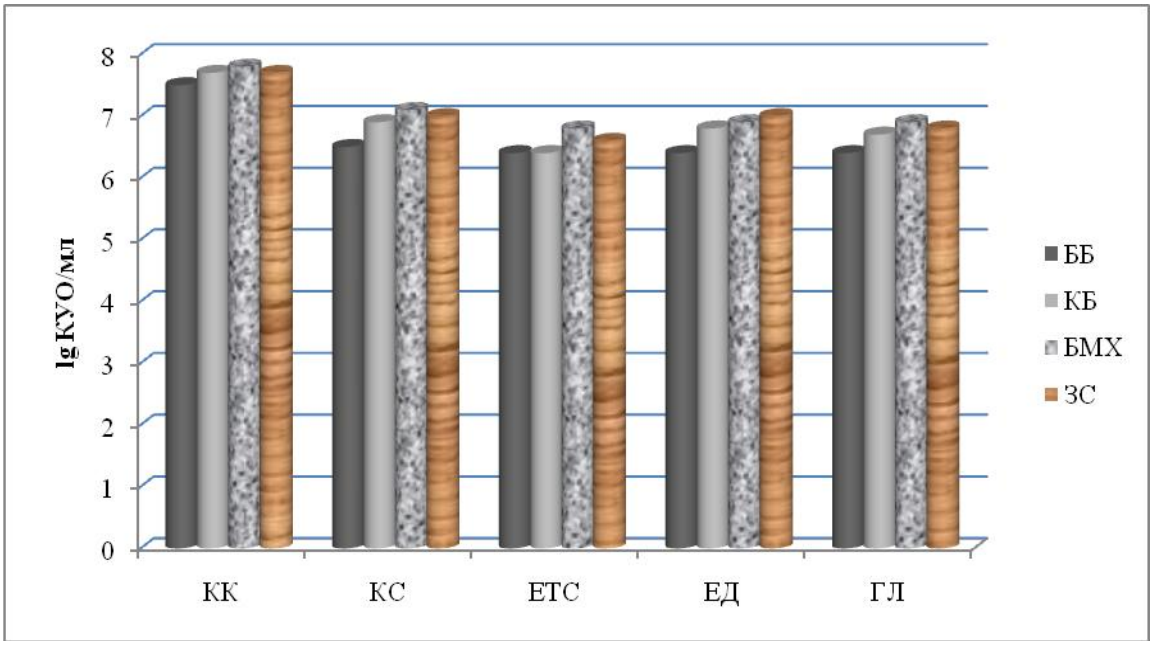

Рис. 2. Показники (lg КУО/мл) H. pylori на середовищах з ростовими добавками (ББ - Brucella-бульйон, КБ - Колумбійський бульйон, БМХ – бульйон Мюллера-Хінтона, ЗС - запропоноване середовище, КК - 5% кінська кров, КС - 5% кінська сироватка, ЕТС - 5% ембріональна теляча сироватка, ГЛ - 2% глутамін, ЕД - 2% екстракт дріжджів).

Таблиця 5

Залежність концентрації H. pylori від складу рідкого живильного середовища (lg КУО / мл)

Компоненти	Контроль			Дослід
	ББ	КБ	БМХ	ЗС
кінська кров + кінська сироватка	7,3	7,4	7,7	7,7
кінська кров + ембріональна теляча сироватка	7,1	7,5	7,9	8,0
кінська кров + глутамін	6,9	7,6	7,8	7,7
кінська кров + екстракт дріжджів	7,2	7,5	7,7	7,8
кінська сироватка + глутамін	5,8	6,5	6,8	6,8
ембріональна теляча сироватка + глутамін	5,9	6,4	6,5	6,5
ембріональна теляча сироватка + екстракт дріжджів	5,7	6,7	6,6	6,6
кінська сироватка + глутамін + + ембріональна теляча сироватка	5,4	6,1	6,2	6,2
кінська сироватка + глутамін + + екстракт дріжджів	5,5	6,1	6,5	6,4
ембріональна теляча сироватка + глутамін + + екстракт дріжджів	5,5	6,2	6,5	6,4
Без добавок	5,4	5,9	6,2	6,2

Примітка. Поживні бульони: ББ - Brucella-бульйон, КБ - Колумбійський бульйон, БМХ - бульйон Мюллера-Хінтона, ЗС - запропоноване середовище

Як видно з даних табл. 5, при додаванні другої добавки до бульйонів збільшився ріст штамів H. pylori. Однак ріст зменшувався, коли в бульйони, що вже містили дві добавки, вносилась третя добавка. Бульйон Мюллер-Хінтона і запропоноване середовище, що містили екстракт дріжджів або кінську сироватку, дали найкращий ріст штамів H. pylori в середовищах без крові.

У п’ятому розділі описано запропонований спосіб детекції H. pylori. Задачею його було поєднання тесту на H. pylori з визначенням pH слизової шлунка, щоб скоротити час на ендоскопічне обстеження при визначенні pH слизової шлунка. Суть даного способу полягала в тому, що при приготуванні середовища для постановки швидкого уреазного тесту замість індикатору фенолового червоного, який має pH переходу забарвлення 6,6 – 8,0, використовують суміш індикаторів: диметиловий оранжевий, метиловий червоний та бромтимоловий синій. Запропонований реактив мав умовну назву ВНВ.

На рівень pH ділянки, звідки взято біопсійний шматочок, вказував колір реагенту, який виникав одразу після внесення в нього цього біоптату. На присутність H. pylori в біоптаті вказувала зміна кольору середовища, що свідчило про зсув pH в лужний бік. Ця зміна кольору відбувалась на протязі перших 5-40 хвилин. По відношенню до контролю реагент ВНВ дав 68 істинно позитивних результатів при трьох хибно позитивних, а також 32 істинно негативних та чотири хибно негативних результатів.

Викладено порівняльну ефективність запропонованого препарату (антимікробний засіб 1) з комбінованою антибактеріальною дією. Нами було

розроблено засіб для лікування виразкової хвороби шлунка та дванадцятипалої кишки, асоційованих з H. pylori, в якому підібрано комбінацію синергічних антимікробних препаратів та включено комплекс речовин, що виконують протективні для слизової оболонки функції. Поставлена задача вирішена наступним складом водорозчинних гранул, мас. %: амоксицилін – 25,0-30,0, нітазол – 2,5-3,0, гліцирам – 0,08-0,12, декаметоксин – 0,008-0,012, пектин – 8,0-12,0, кислота сорбінова – 0,3-0,5, целюлоза мікрокристалічна – 16,0-24,0, крохмаль – 16,0-24,0, цукор – решта.

Нами визначено чутливість 12 штамів H. pylori до запропонованого засобу в порівнянні з препаратом HELICOCIN® (750 мг амоксициліну, 500 мг метронідазолу). Дослідження проводили за методом серійних розведень в бульйоні Мюллера-Хінтона з 10 % кінської сироватки за загальновідомою методикою. Мінімальну інгібуючу концентрацію (МІК) антихелікобактерних засобів визначено у перерахунку на амоксицилін. Результати досліджень ілюструє таблиця 6.

Таблиця 6

Чутливість H. pylori до антимікробних засобів у перерахунку на амоксицилін (мкг/мл)

Антимікробний лікарський засіб	Кількість штамів у дослідах	Чутливість бактерій (M±m, мкг/мл)	p
Антимікробний засіб 1	12	1,25 ± 0,89	<0,05
HELICOCIN®	12	2,08 ± 0,93	

Таким чином, через те, що до складу запатентованого нами препарату входять антибактеріальні компоненти (амоксицилін та нітазол), що володіють синергічною дією, знижено їхні концентрації в препараті. Це дасть змогу знизити рівень побічних реакцій при проведенні ерадикаційної терапії цим засобом.

Водночас незважаючи на знижену концентрацію основних інгредієнтів, засіб володіє хорошою антихелікобактерною активністю, що переконливо показали досліди: рівень МІК запропонованого засобу достовірно менший, ніж у препарату-аналогу HELICOCIN®.

ВИСНОВКИ

У дисертації наведено теоретичне узагальнення, науково обґрунтовано практичне вирішення актуального завдання щодо оптимізації і розробки нових та удосконалення існуючих методів діагностики H. pylori – інфекції на основі застосування нових поживних середовищ, дослідження, розроблених антимікробних лікарських засобів.

1. Встановлено вірогідну різницю ($p<0,01$) за частотою виявлення H. pylori у хворих з ерозіями, виразками слизової оболонки (86,9 %) та із захворюваннями без дефектів слизової (38,5 %). Виділення H. pylori залежить від відділу гастродуоденальної ділянки. Частіше H. pylori виділяють з тіла та антрального відділу шлунка (при захворюваннях з дефектами слизових – на рівні 85,3 %, при

інших станах – в межах від 18,8 % до 58,0 %). H. pylori ізолюються з усіх відділів шлунка і дванадцятипалої кишки в концентрації 5,79±1,34 lg КУО/г біоптату без достовірної різниці між відділами гастродуоденальної ділянки ($p>0,05$).

2. Рівень поширеності H. pylori серед пацієнтів з патологічною ендоскопічною картиною в нашому дослідженні складає 67,6 %. Серед досліджуваних тестів найвищу специфічність мають мікробіологічний (100 %), гістологічний (100 %) методи; швидкий уреазний тест (91,7 %); дихальний уреазний тест (87,5 %); стул-тест (79,2 %). Найвищу чутливість мають швидкий уреазний тест (96,0 %); стул-тест (93,8 %); дихальний уреазний тест (92,0 %). Для пацієнтів, які проходять гастроскопію, доцільне поєднання швидкого уреазного тесту та гістологічного дослідження. У випадках відсутності ендоскопії у хворих показано застосування комбінації неінвазивних тестів (дихальний уреазний тест; стул-тест).

3. Розроблено нове ефективне поживне середовище для виділення H. pylori, яке за рахунок нового складу компонентів, їх кількісного співвідношення дозволяє оптимізувати діагностику хелікобактеріозу. Запропоноване поживне середовище просте за способом його приготування, забезпечує виділення в 94,95% H. pylori в досліджуваному матеріалі. Це поживне середовище не змінює токсигенні властивості H. pylori (токсини CagA; VacA). За результатами досліджень отримано патент України на корисну модель UA88360U «Поживне середовище для виявлення Helicobacter pylori при шлунково-кишкових захворюваннях».

4. Додавання крові до поживних середовищ забезпечує оптимальний ріст H. pylori, однак при роботі з бульйонами, що містять кров, виникають труднощі, і культивування в середовищах без крові є доцільнішим. За ростовими характеристиками кінська сироватка перевершує ембріональну телячу сироватку. Додавання більше двох добавок до бульйонів знижує концентрацію H. pylori.

5. Антимікробний засіб для лікування виразкової хвороби шлунка та дванадцятипалої кишки, асоційованих з H. pylori, проявляє антибактеріальну дію в дозі 1 мкг/мл, яка переважає в два рази відомий антихелікобактерний лікарський препарат Helicocin® (2 мкг/мл).

ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Для уникнення небажаних ефектів поживних середовищ для виділення H. pylori, що містять кров або її похідні, доцільно використовувати розроблене і впроваджене поживне середовище, яке покращує мікробіологічну діагностику хелікобактеріозу і не змінює властивості досліджуваного збудника.

2. Для оптимізації діагностики захворювань гастродуоденальної зони для виявлення H. pylori рекомендовано використання нового біохімічного тесту ВНВ, що дозволяє поєднати інтрагастральну pH-метрію.

3. Для лікування виразкової хвороби шлунка та дванадцятипалої кишки, асоційованих з Helicobacter pylori, доцільно використання комплексного антимікробного засобу після проведення клінічних досліджень цього препарату відповідно до законодавства України.

СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ НАУКОВИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Сучасні погляди на розвиток хелікобактерної інфекції і методи її діагностики / Г. К. Палій, В. В. Власенко, І. Г. Власенко А. О. Новицький, І. К. Палій // Вісник Вінницького національного медичного університету. – 2011. - № 1, Т. 15. – С. 148–153. (*Здобувач взяв участь у вивченні літератури, формулюванні положень та написанні тексту та висновків статті.*).
2. Антихелікобактерна активність озону при лікуванні хворих на пептичну виразку дванадцятипалої кишки / І. Г. Власенко, А. О. Новицький, Г. К. Палій, В. В. Власенко // Biomedical and biosocial anthropology – 2012. - № 18. – С. 55–58. (*Здобувач виконував усім пацієнтам ендоскопічне обстеження з біопсією, виявив активність озону щодо хелікобактерів, взяв участь у формулюванні положень та написанні тексту статті*).
3. Вивчення властивостей клінічних ізолятів Helicobacter pylori та їх чутливість до антибактеріальних препаратів / Г. К. Палій, І. Г. Власенко, А. О. Новицький, В. В. Власенко // Biomedical and biosocial anthropology. – 2012. - № 19. – С. 68–70. (*Здобувач виконував усім пацієнтам ендоскопічне обстеження з біопсією, визначення чутливості хелікобактерів до антибактеріальних препаратів, брав участь в узагальненні результатів*).
4. Характеристика інвазивних та неінвазивних методів діагностики хелікобактерної інфекції / І. Г. Власенко, Г. К. Палій, А. О. Новицький, В. В. Власенко // Вісник Вінницького національного медичного університету. – 2013. - № 2., Т. 17. – С. 438–441. (*Здобувач виконав забір матеріалу для дослідження, виконав неінвазивні та деякі інвазивні методи виявлення хелікобактерів, підготував матеріали до друку*).
5. Власенко В. В. Визначення чутливості Helicobacter pylori до кларитроміцину методом полімеразної ланцюгової реакції / В. В. Власенко, І. Г. Власенко, А. О. Новицький // Сучасна гастроентерологія. – 2014. - № 2 (76).– С. 29–34. (*Здобувач підготував вибірку хворих, збір матеріалу, обробку отриманих даних, підготував матеріали до друку*).
6. Власенко І. Г. Діагностичне середовище для виявлення Helicobacter pylori при шлунково-кишкових захворюваннях / І. Г. Власенко, А. О. Новицький, В. В. Власенко // Biomedical and biosocial anthropology– 2014. - № 22. – С. 60–64. (*Здобувач виконав підбір пацієнтів, збір матеріалу, брав участь у розробці композиції реагенту, апробації запропонованого реагенту, підготував матеріали до друку*).
7. Пат. № 85459 Україна, МПК C 12 N 1/02, C 12 N 1/20. Спосіб виявлення Helicobacter pylori при шлунково-кишкових захворюваннях / Власенко В. В.; винахідники В. В. Власенко, І. Г. Власенко, А. О. Новицький; заявл. 09.04.13 ; опубл. 25.11.13, Бюл. № 22. (*Здобувач виконав підбір пацієнтів, збір матеріалу, брав участь у розробці композиції реагенту, апробацію запропонованого реагенту, підготував матеріали для подачі заявки на корисну модель*).
8. Пат. № 88360 Україна, МПК C 12 N 1/02, C 12 N 1/20. Поживне середовище для виявлення Helicobacter pylori при шлунково-кишкових захворюваннях /

Власенко В. В.; винахідники В. В. Власенко, І. Г. Власенко, А. О. Новицький; заявл. 21.10.13 ; опубл. 11.03.14, Бюл. № 5. (*Здобувач виконав підбір пацієнтів, збір матеріалу, брав участь у розробці композиції середовища, апробацію запропонованого середовища, підготував матеріали для подачі заявки на корисну модель*).

9. Пат. № 92250 Україна, МПК А 61 К 31/00. Засіб для лікування виразкової хвороби шлунка та дванадцятипалої кишки, асоційованих з Helicobacter pylori. / Казмірчук В. В.; винахідники В. В. Казмірчук, Б. І. Гушилик, А. О. Новицький, А. В. Фаталієва, І. П. Юдін, В. В. Власенко, І. О. Ведерникова, І. Ф. Білоконь, С. Л. Крестецька, В. І. Чернявський, О. Р. Гіршфельд, О. І. Грішина, Н. М. Шульга, І. В. Поволокіна , В. Д. Макаренко, І. Ф. Невмержицький; заявл. 24.02.2014 ; опубл. 11.08.2014, Бюл. № 15. (*Здобувач брав участь у розробці композиції антихелікобактерного засобу, визначенні його протимікробної активності*).
10. Vlasenko V. Evaluation of blood-free media for Helicobacter pylori growth / V. Vlasenko, I. Vlasenko, A. Novytskyi // 5th Congress of European microbiologists FEMS 2013, Leipzig, Germany, July 21-25, 2013. – abstract № 382. (*Здобувач провів ендоскопічне обстеження пацієнтів з біопсією, культивування H. pylori на середовищах, що не містять крові, підготував матеріали до подачі в редакцію*).
11. Власенко В. В. Порівняння діагностичних тестів для виявлення Helicobacter pylori / В. В. Власенко, І. Г. Власенко, А. О. Новицький // Тези доповідей XIII з`їзду товариства мікробіологів України ім. С. М. Виноградського - Ялта, 2013. – С. 234. (*Здобувач виконав підбір хворих і постановку дослідів, підготував матеріали до друку*).
12. Власенко В. В. Аналіз захворюваності жителів Вінницького регіону на виразкову хворобу шлунка і дванадцятипалої кишки та гастродуоденіт / В. В. Власенко, А. О. Новицький // Анали Мечніковського інституту. – 2011. - № 4. – С. 28-29. (*Здобувач зібрав дані офіційної статистики щодо показників захворюваності у Вінницькій області, брав участь у обробці отриманих даних*).
13. Новицький А. О. Використання уреазного тесту для виявлення хелікобактера у тварин та людини / А. О. Новицький, В. В. Власенко, І. Г. Власенко // Молоді вчені у вирішенні проблем виробництва та переробки продукції тваринництва : мат. Всеукр. наук.-практ. конф. : тези доп. – Вінниця, 2011. – С. 145-147. (*Здобувач виконав постановку дослідів, формулювання положень тез*).
14. Власенко В. В. Місцеве виявлення Helicobacter pylori на слизовій оболонці шлунка / В. В. Власенко, А. О. Новицький // Сучасні проблеми епідеміології, мікробіології, гігієни та туберкульозу : 10-ї наук.-практ. конф. з міжнар. участю приуроченої до Дня науки : наук. праці. – Львів, 2013. – Вип. 10. – С. 80–82. (*Здобувач розробив композицію для швидкого уреазного тесту, виконав підбір хворих і постановку дослідів*).

АНОТАЦІЯ

Новицький А. О. Оптимізація мікробіологічного виявлення Helicobacter pylori. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія. – Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова МОЗ України, Вінниця, 2015.

У дисертації наведені дані мікробіологічних досліджень біоптатів шлунка і дванадцятипалої кишки 126 хворих на гастродуоденіти та виразкову хворобу; виявлено частоту виділення H. pylori, їх концентрацію, мікробіологічні властивості, чутливість до антихелікобактерних засобів. Проведено дослідження чутливості, специфічності, точності інвазивних і неінвазивних методів діагностики хелікобактерної інфекції, доступних на сучасному етапі. Розроблено агаризоване поживне середовище для спрощеної бактеріологічної діагностики хелікобактеріозу. Розроблено спосіб та діагностичне середовище для виявлення H. pylori при шлунково-кишкових захворюваннях біохімічним методом. Вивчено специфічність і ефективність запропонованих методів діагностики. Розроблено засіб для лікування хелікобактер-асоційованих захворювань, в якому включено сінергічну комбінацію антибактеріальних препаратів та комплекс протективних для слизової оболонки шлунково-кишкового тракту речовин.

Ключові слова: Helicobacter pylori, діагностика, культивування, швидкий уреазний тест, полімеразна ланцюгова реакція.

АННОТАЦИЯ

Новицкий А. А. Оптимизация микробиологического выявления Helicobacter pylori. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.00.07 – микробиология. – Винницкий национальный медицинский университет имени Н. И. Пирогова МЗ Украины, Винница, 2015.

В диссертации приведены данные экспериментальных исследований. Установлена достоверная разница ($p<0,001$) по частоте культивирования хеликобактеров у больных с эрозиями или язвами слизистой оболочки (86,9 %) и с заболеваниями без дефектов слизистой (38,5 %). Выделение H. pylori также зависит от отдела гастродуоденальной области, откуда берётся биопсия. Так, чаще хеликобактеры культивировались из тела и антрального отдела желудка (при заболеваниях с дефектами слизистых – на уровне 85,3 %, при других состояниях – в пределах от 18,8 % до 58,0 %). Установлено, что H. pylori культивируется изо всех отделов желудка и двенадцатиперстной кишки в средней концентрации (5,79±1,34) lg КОЕ/г биоптата без достоверной разницы между отделами гастродуоденальной области.

Дана характеристика инвазивных и неинвазивных методов диагностики хеликобактериоза: бактериологического, гистологического, биохимического (быстрого и дыхательного уреазного тестов) и стул-теста. Чувствительность и специфичность этих тестов составили соответственно: 86,0 % и 100 %, 90,0 % и 100%, 96,0 % и 91,7 %, 90,0 % и 87,5 %, 93,7 % и 79,2 %. В общем уровень инфицирования пациентов с патологической эндоскопической картиной в нашем исследовании составил 67,6 %. В нашем исследовании больные считались

инфицированными H. pylori, когда три и более из пяти тестов у них были положительными, и не инфицированными, когда три и более из пяти тестов были отрицательными. Полученные результаты свидетельствуют об отсутствии универсального теста на хеликобактериоз. Таким образом, для наилучшей точности показано сочетание быстрого уреазного теста и гистологии пациентам, которые проходят гастроскопию, либо дыхательного уреазного теста и стул-теста пациентам, которые не проходят гастроскопию.

Разработана питательная среда для упрощенного выявления H. pylori. Среда в своем составе не имеет крови или ее препаратов, что помогает избежать недостатков и опасностей при работе со средами с этими небезопасными биологическими жидкостями. Показано, что средний индекс чувствительности среды составил 94,95 % по сравнению с агаром Мюллера-Хинтона с 5 % овечьей крови, что является достаточно хорошим результатом. Методом полимеразной цепной реакции проведено определение присутствия у выращенных на предложенной среде H. pylori генов, ответственных за образование наиболее значимых токсинов – CagA и VacA. Установлено, что культивирование хеликобактерий не приводит к изменению их токсинообразования. Предложенная питательная среда проста по ее приготовлению, не имеет недостатков сред с кровью или ее компонентами; имеет хороший показатель чувствительности роста колоний, не удлиняет времени получения колоний, не влияет на токсинообразование H. pylori.

Разработан способ и диагностическая среда для выявления H. pylori биохимическим способом при одновременной регистрации pH слизистой желудка. Установлено, что специфичность, чувствительность, позитивное, негативное прогностическое значение и точность предложенного диагностикума составили соответственно (в %): 91,4 % (±3,1), 94,4 % (±4,1), 95,8 % (±2,9), 88,9 % (±6,2), 93,5 % (±4,4). Результаты определения pH биоптатов коррелируют с данными интрагастральной pH-метрии (r=0,65).

Разработанный тест может использоваться при рутинном обследовании гастроэнтерологических больных, уменьшить длительность обследования.

Усовершенствованы питательные среды для диагностики хеликобактериоза, показана высокая чувствительность предложенной среды. Отмечено также снижение роста хеликобактеров в средах, имеющих в составе более двух стимуляторов роста.

Создано средство для лечения язвенной болезни желудка и двенадцатиперстной кишки, ассоциированных с H. pylori, в котором сочетается синергизм антибактериальных препаратов и включен комплекс протективных веществ, и таким образом созданы предпосылки для минимизации негативных побочных эффектов средств эрадикационной терапии. Минимальная ингибирующая концентрация предложенного средства составила 1 мкг/мл, против 2 мкг/мл в средстве HELICOCIN®.

Ключевые слова: Helicobacter pylori, диагностика, культивирование, быстрый уреазный тест, полимеразная цепная реакция.

SUMMARY

Novytskyi A. O. Optimization of microbiological detection of Helicobacter pylori. – Manuscript.

The dissertation for candidate of medical sciences degree in specialty 03.00.07 – microbiology. – Vinnytsya National Pirogov Memorial Medical University, Ministry of Health of Ukraine, Vinnytsya, 2015.

The thesis presents the experimental and clinical studies: analysis of morbidity Vinnytsya region in H. pylori-dependent diseases: gastric and duodenal ulcer and gastro-duodenitis. The sensitivity, specificity, accuracy of available invasive and non-invasive methods for diagnosis of H. pylori infection were studied. The agar culture medium for the presumptive bacteriological diagnosis of the helicobacteriosis was developed. The method and diagnostic medium for H. pylori detection in gastrointestinal diseases by biochemical method was proposed. The specificity and effectiveness of the proposed methods for diagnosis of H. pylori were studied. Culture media to highlight H. pylori were improved. A remedy for the treatment of Helicobacter-associated diseases, which due synergic combination of antimicrobials and the inclusion of complex of protective substances, minimizes the negative side effects of eradication therapy means, was constructed.

Keywords: Helicobacter pylori, diagnosis, cultivation, rapid urease test, polymerase chain reaction.