

**АО «Медицинский университет Астана»**

УДК: 616.33-002.2-08:616.34-008.87-052  
МПК-А61К36/00А61Р1/04

**Капасова Айсулу Глеугазыевна**

**НАРУШЕНИЯ КИШЕЧНОЙ МИКРОБИОТЫ У БОЛЬНЫХ С  
HELICOBACTER PYLORI - АССОЦИИРОВАННЫМ ХРОНИЧЕСКИМ  
ГАСТРИТОМ ДО И ПОСЛЕ ЭРАДИКАЦИИ. ВОЗМОЖНОСТИ  
КОРРЕКЦИИ.**

**6М110100 Медицина**

Диссертация на присуждение академической  
степени магистра медицинских наук

Научный руководитель \_\_\_\_\_

доктор медицинских наук Бектаева Р.Р.

Научный консультант \_\_\_\_\_

доктор биологических наук Бисенова Н.М.

Официальный оппонент \_\_\_\_\_

доктор медицинских наук Искаков Б.С.

Астана 2017

## СОДЕРЖАНИЕ

НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ.....	3
ОПРЕДЕЛЕНИЯ.....	4
ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ.....	5
СПИСОК ТАБЛИЦ И РИСУНКОВ.....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	8
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	
1.1 История и эпидемиология инфекции <i>Helicobacter pylori</i> .....	13
1.2 Факторы патогенности <i>Helicobacter pylori</i> .....	14
1.3 Влияние <i>H.pylori</i> на состояния кишечной микробиоты.....	16
1.4 Эрадикационная терапия направленная на <i>Helicobacter pylori</i> .....	16
1.5 Изменения состава кишечной микробиоты на фоне приема эрадикационной терапии.....	21
1.6 Антогонизм микроорганизмов толстого кишечника.....	24
1.7 Методы диагностики нарушения кишечной микрофлоры. ....	25
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
2.1 Клиническая характеристика больных.....	28
2.2 Методы исследования.....	31
2.2.1 ЭГДС с использованием ХЕЛПИЛ теста для экспресс-диагностики инфекции <i>H. pylori</i> .....	31
2.2.2 Иммунохроматографический экспресс-тест определения антигенов <i>H. pylori</i> в кале.....	32
2.2.3 Изучение количественного и качественного состава микрофлоры кишечника больных.....	34
2.2.4 Статистический анализ.....	38
3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	
3.1 Показатели микробиологических исследований микрофлоры фекалий обследованных до и после применения пробиотика Бифиформ .....	39
3.1.1 Показатели микробиологических исследований микрофлоры фекалий обследованных до и после применения биологической активной добавки БАД «Ультробиотик» .....	43
3.1.2 Показатели микробиологических исследований микрофлоры фекалий обследованных до и после эрадикационной терапии без использования пробиотиков .....	46
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	52
ВЫВОДЫ.....	54
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	55
СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ.....	56

## НОРМАТИВНЫЕ ССЫЛКИ

В настоящей диссертации использованы ссылки на следующие стандарты:

1. Государственная программа развития образования Республики Казахстан на 2011 – 2020 годы;
2. Указ Президента Республики Казахстан от 1 февраля 2010 г. № 922 «О Стратегическом плане развития Республики Казахстан до 2020 года»;
3. Постановление правительства Республики Казахстан № 41 "Об увеличении плана мероприятий по реализации Государственной программы развития здравоохранения Республики Казахстан «Саламатты Казахстан» на 2011-2015 годы", г. Астана, 2011;
4. Инструкция по оформлению диссертации и автореферата» - приказ председателя ВАК МОН Республики Казахстан №377-Зж от 28.09.2004г.
5. ГОСО РК-7.09.108–2009г. Утвержден приказом МЗ РК №261 от 17.06.2011г. Послевузовское образование. Магистратура.
6. МС ISO 9000:2005. Системы менеджмента качества. Основные положения и словарь;
7. МС ISO 9001:2008. Системы менеджмента качества. Требования;
8. МС ISO 27001:2005. Системы менеджмента информационной безопасности. Требования;
9. МС ISO 26000:2010. Руководство по социальной ответственности;
10. СУ-МУА-01. Стандарт университета. Общие требования к содержанию, изложению и оформлению документации интегрированной системы менеджмента;
11. СУ-МУА-02. Стандарт университета. Управление документацией;
12. СУ-МУА-03. Стандарт университета. Управление записями;
13. СУ-МУА-04. Стандарт университета. Термины и определения.

## ОПРЕДЕЛЕНИЯ

В настоящей диссертации применяются следующие термины с соответствующими определениями:

*Микробиота* - (нормальная микрофлора, нормофлора) человека – это совокупность всех микроорганизмов в теле человека.

*Факультативная микрофлора* – (условнопатогенная и сапрофитная микрофлора); представлена пептококками, стафилококками, стрептококками, бациллами, дрожжевыми и дрожжеподобными грибами.

*Облигатная флора* – это микроорганизмы, постоянно населяющие кишечник, выполняющие как защитные функции, так и участвующие в обмене веществ.

*Дисбиоз* - это изменение состава и количественных соотношений нормальной микрофлоры (микроорганизмов), которые заселяют человеческий организм.

*Заболеваемость* – медико-статистический показатель, определяющий число заболеваний, впервые зарегистрированных за календарный год среди населения, проживающего на какой-то конкретной территории.

*Статистика* - одна из общественных наук, которая занимается сбором, упорядочиванием, анализом числового представления фактов, относящихся к самым разнообразным массовым явлениям.

## ОБОЗНАЧЕНИЯ И СОКРАЩЕНИЯ

ВОЗ – всемирная организация здравоохранения  
ВЗК - воспалительными заболеваниями кишечника  
ДПК – двенадцатиперстная кишка  
ЖКТ- желудочно-кишечный тракт  
ИПП – ингибитор протонной помпы  
ИФА – иммуноферментный анализ  
РЖ - рак желудка  
СОЖ - слизистая оболочка желудка  
СРК - синдром раздраженного кишечника  
ССС - сердечно сосудистую систему  
ХГ - хронический гастрит  
ЭГДС - эзофагогастродуоденоскопия  
ЯБ - язвенная болезнь  
IARC - International Agency for Research on Cancer  
НР - Helicobacter pylori  
MALT - mucosa-associated lymphoid tissue  
TNF – фактор некроза опухолей

## СПИСОК ТАБЛИЦ И РИСУНКОВ

Таблица 1	Опыт применения пробиотиков для достижения эрадикации <i>Helicobacter pylori</i> .....	22
Таблица 2	Оценка эффективности эрадикации <i>H. pylori</i> у больных <i>H. pylori</i> ассоциированными заболеваниями при использовании различных схем терапии (эрадикация в комплексе с пробиотком).....	23
Таблица 3	Качественный и количественный состав нормальной микрофлоры толстого кишечника у здоровых лиц.....	24
Рисунок 1	Данные двух методов диагностики на наличие <i>H. pylori</i> .....	28
Таблица 4	Характеристика пациентов участвующих в исследовании.....	29
Рисунок 2	Дизайн исследования.....	30
Рисунок 3	Тест-система ХЕЛПИЛ.....	31
Рисунок 4	Оценка результатов тестирования тест системы ХЕЛПИЛ...	32
Рисунок 5	Иммунохроматографический экспресс- тест.....	33
Рисунок 6	Интерпретация результатов теста экспресс stool-тест на наличие антигена <i>H. pylori</i> в кале.....	34
Таблица 5	Результаты микробиологического исследования фекалий на дисбактериоз до и после эрадикации в комплексе с пробиотиком «Бифиформ».....	39
Таблица 6	Клинические показатели до, во время после лечения в группе со стандартной эрадикационной терапией и приемом пробиотика «Бифиформ».....	41
Рисунок 7	Клинические показатели пациентов до и после эрадикационной терапии принимавших пробиотик Бифиформ.....	42
Таблица 7	Результаты микробиологического исследования фекалий на дисбактериоз до и после эрадикации в комплексе с БАД «Ультробиотик» .....	43
Таблица 8	Клинические показатели пациентов до, во время и после лечения, в группе со стандартной эрадикационной терапией в комплексе с БАД «Ультробиотик».....	45
Рисунок 9	Клинические показатели до и после эрадикационной терапии в группе с комплексным использованием эрадикационной терапии и пробиотика «Ультробиотик»....	46
Таблица 9	Результаты микробиологического исследования фекалий обследованных до и после эрадикации без приема пробиотиков.....	46
Таблица 10	Клинические показатели до, во время после лечения в контрольной группе без применения пробиотиков.....	48
Рисунок 10	Клинические показатели пациентов до и после эрадикационной терапии без пробиотиков.....	49

Рисунок 11	Показатели клинического исследования во время эрадикационной терапии в разных группах.....	50
Рисунок 12	Эффективность эрадикации в разных группах.....	51

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность темы**

В 1983 г. произошло великое событие в гастроэнтерологии, J.R Warren и В.Ж. Marshall обнаружили в желудке неизвестный прежде микроорганизм, который в последствии был назван *Helicobacter pylori*, тем самым совершили переворот в мировой медицине.

Инфекция, *Helicobacter Pylori* (НР) является одной из глобальных проблем современной медицины с прогрессивно возрастающей частотой инфицирования, в развивающихся странах до 70 – 90% и в развитых странах до 25 – 50%. Повреждающие механизмы бактерии многообразны - от прямого действия факторов вирулентности до иммуноопосредованных деструктивных реакций, которые являются причиной развития хронического гастрита и с течением времени возможных серьезных последствий, начиная от пептической язвы желудка до аденокарциномы и лимфомы мукоза-ассоциированной лимфоидной ткани (MALT- mucosa-associated lymphoid tissue). Своевременная эрадикация предотвращает эти последствия и является доказанной стратегией, снижающей риск развития рака желудка [1, 2, 3].

В 1994 г. Международное агентство по изучению рака (IARC- International Agency for Research on Cancer), являющееся подразделением Всемирной организации здравоохранения зарегистрировало НР как канцероген I класса, официально признав его в качестве одной из причин, способствующих развитию рака желудка (РЖ) [16,17,18].

Тем не менее, по данным последних исследований, во многих странах мира отмечается снижение эффективности лечения при использовании стандартной, тройной терапии (двух антибиотиков и ингибиторов протонной помпы-ИПП) вследствие развития антибиотикорезистентности. Так, устойчивость к кларитромицину наблюдается в диапазоне 11-63%, к метронидазолу – 17–86% и к левофлоксацину - 14-24%. Использование новых схем для преодоления резистентности к антибиотикам с применением квадротерапии на основе препаратов висмута последовательной и сопутствующей терапии, привели к улучшению результатов эрадикации НР до 92% [4, 5, 6, 7].

Однако новые комбинации вызывают увеличение частоты побочных эффектов, а именно при последовательной терапии их количество достигает 23%, а при сопутствующей терапии- 46% [1]. В ежедневной практике терапевты сталкиваются с такими частыми побочными эффектами антибиотиков как: диарея, тошнота, рвота, абдоминальные боли и вздутие живота, что является исходом нежелательного воздействия антибактериальной терапии на облигатную микрофлору желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), проявляющуюся изменением состава микробиоты кишечника. При этом результаты ряда опубликованных исследований демонстрируют низкие показатели эффективности лечения в 62-67% случаев [8]. Таким образом, слабая приверженность пациентов к назначаемой эрадикационной терапии, в связи с развитием побочных эффектов, является основной причиной прекращения



лечения, что в свою очередь способствует возникновению устойчивых к антибиотикам штаммов НР, усугубляя тем самым проблему недостаточной эффективности терапии.

### **Цель исследования**

Изучить нарушения кишечной микробиоты у больных с *Helicobacter pylori*-ассоциированных хроническим гастритом до и после эрадикации, провести сравнительный анализ эффективности пробиотических средств в комплексной эрадикационной терапии.

### **Предмет исследования**

Кал на дисбактериоз у больных с *H. pylori*-ассоциированным хроническим гастритом до и после эрадикации. Первичный посев кала проводили количественным методом на питательные среды в соответствии с нормативными документами. Идентификация выделенных чистых культур микроорганизмов проводилась на микробиологических анализаторах «MiniAPI» и «Vitek 2 – Compact».

### **Объекты исследования**

Пациенты с *Helicobacter pylori*-ассоциированным хроническим гастритом.

### **Задачи исследования**

1. Изучить микробиоциноз кишечника у больных с *H. pylori*-ассоциированным хроническим гастритом до эрадикации.
2. Оценить состояние микробиоциноза кишечника у больных с *H. pylori*-ассоциированным хроническим гастритом после комплексной эрадикации с использованием пробиотиков (оригинальный препарат «Бифиформ» и биологически активная добавка «Ультрабиотик»).
3. Оценить клинические особенности во время эрадикации в разных группах.
4. Оценить эффективность эрадикации у пациентов с *H. pylori*-ассоциированным хроническим гастритом с помощью неинвазивного экспресс теста, иммунохроматографического анализа (ИХА) для определения антигенов *H. Pylori* в кале.

### **Материалы исследования**

1. Пациентам обратившимся к гастроэнтерологу с синдромом гастралгии и диспепсии, было проведено инвазивное обследование эзофагогастродуоденоскопия (ЭГДС) с определением *H. pylori* экспресс ХЕЛПИЛ тестом.
2. Для подтверждения *H. pylori*, пациенты дополнительно обследованы с использованием неинвазивного stool-теста на наличие антигена *H. pylori* в кале в течении 3 дней после проведенного ЭГДС.

3. Учитывая данные двух методов диагностики, пациентам выставившим диагноз хронический гастрит НР ассоциированный, перед проведением эрадикационной терапии, было рекомендовано сдать анализ кала на дисбактериоз в центр санитарно-эпидемиологической экспертизы. После оценки результатов кишечной микробиоты пациентам назначалась эрадикационная терапия которая проводилась в течении 10 дней с использованием ИПП (нольпаза 40 мг по 1 таб х 2 раз в день в течении 15 дней) и двух антибиотиков (флемоксин салютаб 1000 мг по 1 таб х 2 раз в день и фромилид 500 мг по 1 таб х 2 раз в день согласно IV Маастрихтскому консенсусу, в течении  $\pm 10$  дней после проведенной терапии пациенты сдавали повторно анализ на дисбактериоз для оценки влияния эрадикационной терапии на состав кишечной микробиоты у разных групп с применением и без применения пробиотиков. Для оценки эффективности эрадикационной терапии использован неинвазивного stool-тест на наличие антигена *H. pylori* в кале в течении 4 недель после окончания эрадикации.

### **Методы исследования**

1. Проводилось клиническое обследование пациентов (производился сбор жалоб, анамнеза жизни, анамнеза заболевания, объективный осмотр).
2. Эзофагогастродуоденоскопия (ЭГДС) с определением НР экспресс ХЕЛПИЛ тестом.
3. Иммунохроматографической тест системы PreventID для определения антигенов НР в кале (экспресс тест)
4. Первичный посев кала количественным методом на питательные среды в соответствии с нормативными документами дважды (до и после эрадикационной терапии).
5. Статистический метод обработки полученных данных.

### **Научная новизна результатов исследования**

1. В данном исследовании впервые в Казахстане установлены результаты исследования состояния кишечной микрофлоры у больных с *Helicobacter pylori*-ассоциированным хроническим гастритом до и после эрадикационной терапии с применением пробиотика «Ультробиотик», а также его активность для восстановления кишечного биоценоза.
2. Установлена корреляция показателей экспресс stool-тест для определения антигенов *H. pylori* в кале с помощью моноклональных антител методом иммунохроматографического анализа в сравнении с инвазивным методом ЭГДС с определением *H. pylori* экспресс ХЕЛПИЛ тестом.
3. Впервые использован экспресс stool-тест для определения антигенов *H. pylori* в кале с помощью моноклональных антител методом иммунохроматографического анализа как высокоспецифичный метод диагностики *Helicobacter pylori* для первичной диагностики и оценке эффективности эрадикации, на фоне использования пробиотической терапии.

### **Теоритическая и практическая значимость**

1. Показана возможность повышения эффективности стандартной эрадикационной терапии в комплексе с пробиотическими препаратами, а также возможность применения (оригинальный препарата «Бифиформ» и биологически активная добавка «Ультрабиотик») при НР-ассоциированном гастрите с целью преду-преждения побочных действию во время приема эрадикационной терапии.

2. Неинвазивный экспресс stool-тест для определения антигенов *H. pylori* в кале является эффективным методом диагностики *H. pylori* до и после эрадикационной терапии, учитывая высокую чувствительность, специфичность и точность. Данный метод не имеет противопоказаний, а также является удобным в применении и исключает риск артификального механизма передачи инфекции.

### **Основное положение, выносимые на защиту**

1. У пациентов с *H.pylori*-ассоциированным гастритом в большинстве случаев имеют место дисбиотические нарушения. Применение стандартной эрадикационной терапии неблагоприятно влияет на состояние кишечного микробиоценоза. Комбинация стандартной эрадикационной терапии с пробиотическим препаратом улучшает состояние кишечной микрофлоры и повышает эффективность эрадикации.

2. Пробиотики «Бифиформ» и «Ультрабиотик» могут быть использованы в качестве профилактики развития побочных действию во время приема эрадикации у пациентов с *H.pylori*-ассоциированным гастритом.

3. Экспресс stool-тест для определения антигенов *H. pylori* в кале с помощью моноклональных антител методом иммунохроматографического анализа может быть как высокоспецифичный метод диагностики *H. pylori* для первичной диагностики и оценки эффективности эрадикации.

### **Объем и структура диссертации**

Диссертация состоит из введения, пяти глав, выводов, практических рекомендаций и списка использованных источников. Диссертация изложена на 63 страницах машинописного набора, иллюстрирована 10 таблицами, 11 рисунками, гистограммами и рисунками.Список используемых источников содержит 110 работ из них 15 отечественных и 95 иностранных источников литературы.

### **Апробация работы**

Основные положения диссертации изложены в тезисе к докладу на международной научно-практической конференции молодых ученых на тему «Состояние кишечной микрофлоры у больных с *Helicobacter pylori* ассоциированным хроническим гастритом после эрадикационной терапии». Доклад на научно-практической конференции на тему «Профилактика

нарушения кишечной микробиоты у больных с НР - ассоциированным хроническим гастритом во время эрадикационной терапии».

### **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано пять печатных работ, из них 2 статьи, 3 тезиса в журналах рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки МОН РК.

### **Публикации по теме диссертации**

По материалам диссертационной работы было опубликовано: 5 печатных работ: из них 2 статьи, 3 тезиса:

1. Капасова А.Т. «Нарушения кишечной микробиоты у больных с *Helicobacter pylori*-ассоциированным хроническим гастритом до эрадикации» Сборник тезисов международной научно-практической конференция молодых ученых и студентов, г Астана 14-15 апреля 2016г. Стр 143.

2. Капасова А.Т., Бисенова Н.М., «Микробиоценоз кишечника пациентов, инфицированных *Helicobacter pylori*». Российский журнал Гастроэнтерологии, Гепатологии, Колопроктологии. Московская двадцать вторая объединенная российская гастроэнтерологическая неделя с 3-5 октября 2016г., г Москва. Стр 19.

3. Капасова А.Т., «*Helicobacter pylori* инфекция и ее влияние на состав микробиоты кишечника». (Обзор литературы). «Валеология: здоровье-болезнь-выздоровление», №4 2016г. Стр 65.

4. Бисенова Н.М., Бектаева Р.Р. Капасова А.Т. «Нарушение кишечной микробиоты у больных с *Helicobacter pylori*- ассоциированным хроническим гастритом до и после эрадикации. Возможности коррекции». «Клиническая медицина Казахстана» .№1 , 2017г. Стр 21.

5. Капасова А.Т., Бектаева Р.Р., Бисенова Н.М. « Состояние кишечной микрофлоры у больных с *Helicobacter pylori*- ассоциированным хроническим гастритом после эрадикационной терапии». Сборник тезисов международной научно-практической конференция молодых ученых и студентов, г Астана. 13-14 апреля 2016г. Стр 81.

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1.1 История и эпидемиология инфекции *Helicobacter pylori*

В 1984 г произошел прорыв в гастроэнтерологии в рамках изучения инфекции *H. Pylori*, два австрийских ученых Б.Маршалл и Д. Уоррен опубликовали в самом известном журнале *Lancet* данные о обнаружении спиралевидной бактерии в слизистой оболочке желудка при хроническом гастрите и язвенной болезни. Это открытие было главным достижением XX века.

НР является одной из самых распространённых инфекции у человека. Хронический гастрит это заболевание которое характеризуется воспалительными и дистрофическими процессами в слизистой оболочке желудка. Распространенность инфицированных в развивающихся странах приблизительно до 70 – 90% и в развитых странах до 25 – 50%.

В основном заражение происходит в детском возрасте от инфицированной матери. При проведённом исследовании новорожденных на наличие антител на НР в крови была выдвинуто предположение о трансплантационном пути передачи [58,59].

Б.Маршалл впервые открывший НР поставил эксперимент на себе, заразив себя инфекцией НР он наблюдал за клиническим течением инфицирования по дням. Так в первый день заражения отмечалось повышение перистальтики кишечника и вздутие живота. В течении 6 суток не наблюдалось клинических жалоб, на 7 день инфицирования появилось тяжесть после приема пищи, голодные боли в утренние часы, незначительная рвота - синдром гастралгии. Полученные данные наблюдались и у других лиц, которые подвергли себя заражению. При приеме курса антибактериальной терапии клинические жалобы были купированы [59,60].

Наиболее восприимчивы к инфекции НР лица пожилого возраста, мужской пол, малоимущие, проживающие в селах, недостаточно образованные, многодетные семьи, семьи с низким доходом [51].

Источником инфекции является человек. Бактерии были выделены из содержимого верхних отделов желудочно-кишечного тракта и прямой кишки у больных людей. Возможны случаи заражения от домашних животных, при исследовании у них были выделены активные кокковые формы НР.

Исследование, проведенное в Южной Индии показало, что лица употребляющие сырую воду более инфицированы (92%) по сравнению с употребляющими бутилированную воду (75%). Большую роль на наличие инфицирования влияет состояние окружающей среды, качество употребляемой воды. Y.Mogento показал, что НР способен выжить в хлорированной воде и культивироваться в течении 3 часов [60,61].

Существует теория о фекально-оральном пути передачи НР. F. Megraud установил что пережёванная пища инфицированной матерью для своего ребенка повышает риск инфицирования ребенка. Так как микроб был выделен с налета зубов у лиц с хроническим гастритом ассоциированным НР.

Инфицирование происходит в семье при пользовании предметами личной гигиены. Инфицировать друг друга можно при поцелуях, использовании кухонных приборов, облизывании сосок и других детских предметов. На основании многочисленных исследований и наблюдений было установлено что члены семьи инфицированные НР были заражены гораздо больше чем в неинфицированных семьях[62,63].

Наблюдается повышение частоты инфицирования НР в следующих коллективах: интернатах, лечебницах, армейских подразделениях, школьных учреждениях. Медицинские работники чаще заражаются НР, учитывая постоянный контакт с инфекцией.

Существует искусственный механизм передачи возбудителя при недобросовестной обработке и стерилизации зонда и эндоскопа.

## **1.2 Факторы патогенности *Helicobacter pylori***

*H. pylori* - грамотрицательная спиралевидная бактерия, чья экологическая ниша желудок человека. Повреждающие механизмы - начиная от пептической язвы желудка до и лимфомы мукоза-ассоциированной лимфоидной ткани (MALT-лимфома). В последние годы достоверной считается связь между НР и развитием рака желудка. Сильнее эта корреляция проявляется при длительном периоде инфицирования в зонах повышенного риска в старшей возрастной группе населения (Crespi, 1996; Graham, 1993). Механизм канцерогенеза, ассоциированного с НР, связан со способностью микроорганизма вызывать выраженный инфильтративный гастрит с пролиферацией интерстициальных клеток. Длительный период воспаления вызывает процессы атрофии и кишечной метаплазии, которую следует рассматривать как предраковые изменения для развития рака желудка кишечного типа. Доказано, что у больных, инфицированных НР, риск развития аденокарциномы желудка увеличивается в 3,6-3,8 раза по сравнению с неинфицированными. На сегодняшний день *Helicobacter pylori* относят к канцерогенам I разряда.

В Африке и Южной Азии заболеваемость раком желудка значительно ниже, чем в странах Восточной Азии, хотя распространенность инфекции НР в каждом из этих регионов высока. Даже в Восточной Азии заболеваемость раком желудка изменяется, уменьшаясь в более южных широтах. [41-45]. Географические различия в заболеваемости раком желудка можно объяснить, по крайней мере отчасти, наличием различных факторов вирулентности НР, особенно *CagA*, *VacA* и *OipA*. Однако до сих пор неясно, почему патогенность НР увеличивалась по мере ее миграции из Африки в Восточную Азию в ходе эволюции.

НР играет важную роль в развитии различных гастродуоденальных заболеваний. Однако лишь у небольшой части людей, инфицированных НР развиваются гастродуоденальные заболевания.

Предполагают, что инфекция *H. pylori* участвует в развитии язвы двенадцатиперстной кишки, которая находится на противоположном конце спектра болезни, к раку желудка. Несмотря на успехи в нашем понимании

развития заболеваний, связанных с НР, требуется дальнейшая работа для выяснения роли факторов вирулентности НР.

CagA - является наиболее широко изученным фактором вирулентности НР. Существует два типа клинических типа НР: штаммы, продуцирующие CagA (cagA позитивные), и CagA-отрицательные (cagA отрицательные) штаммы. Исследования монгольских песчанок показали, что рак желудка развился у тех животных, инфицированных НР дикого типа, но не у животных, инфицированных изогенными мутантами cagA. С тех пор в другом исследовании сообщалось, что рак желудка и другие злокачественные новообразования имели место у некоторых трансгенных мышей, которые искусственно вводили белок CagA. Эти данные привели к увеличению знаний о CagA как о канцерогенезе бактерий. В западных странах сообщалось, что люди, инфицированные cagA-положительными штаммами *H. pylori*, имеют более высокий риск развития пептической язвы или рака желудка, чем те, у которых инфицированы cagA-негативными штаммами. Однако в Восточной Азии большинство штаммов НР имеют ген cagA независимо от заболевания; Поэтому патогенную разницу в Восточной Азии, поэтому, трудно объяснить просто с точки зрения наличия или отсутствия одного только гена cagA [42-47].

VacA-это токсин который вызывает вакуольную дегенерацию эпителиальных клеток. Он состоит из нескольких генетических подтипов. Одним из самых токсичных является *slml*, генотип чаще всего выявляется у пациентов с язвенной болезнью. В дополнение к индуцированию вакуолизации, VacA может индуцировать множественные клеточные активности, включая образование мембранных каналов, высвобождение цитохрома с из митохондрий, приводящее к апоптозу, и связывание с рецепторами клеточных мембран с последующим иницированием провоспалительного ответа. VacA также могут специфически ингибировать активацию и пролиферацию Т-клеток. Исследования показывают, что VacA и CagA могут даже ингибировать по крайней мере некоторые сигнальные пути друг друга. Например, было показано, что CagA стимулирует экспрессию апоптотического супрессора Mcl1 и ингибирует апоптоз эпителиальных клеток, вызываемый VacA. Эти данные еще раз подчеркивают важность экспериментов по заражению *in vitro*, в которых можно учитывать взаимодействие между факторами вирулентности НР [48-56].

IceA-служит фактором индуцирования НР с эпителием. Существует два варианта IceA: ice A1 и ice A2. ice A1 обнаруживается у 50 % больных с язвенной болезнью. ice A2 был выявлен только у лиц с хроническим гастритом.

OipA -предполагается, что приблизительно 4% генома НР кодируют белки наружной мембраны (OMP), некоторые из которых могут функционировать как адгезины. Одним из таких OMP является OipA, который был идентифицирован в 2000 году. Функциональный статус OipA регулируется с помощью ложного спаривания, которое определяется количеством СТ-динуклеотидных повторов в 5'-области гена [57-59].

### **1.3 Влияние НР на состояния кишечной микробиоты**

Известно, что как НР, так и кишечная микробиота влияют на метаболизм хозяина. Микрофлора кишечника является самой богатой и разнообразной по своему составу по сравнению с другими микробными сообществами организма человека. Она формируется при рождении через контакт с родовыми путями матери, кожей и фекальными микроорганизмами [9]. Со временем в процессе постоянного взаимодействия макро- и микроорганизма образуется уникальная экосистема, микрофлора усложняется, более разнообразным становится ее видовой состав. J.C. Stearns и соавторы изучали микробиотную картину различных отделов ЖКТ у четырех здоровых добровольцев. Их результаты выявили наибольшее значение индекса биологического разнообразия (индекс Шеннона) и филогенетическую разнородность в образцах из толстой кишки и фекалиях, чем в желудке [10]. Используя новые технологии метагеномного анализа, исследователи продемонстрировали влияние микробиоценоза кишечника на иммунный гомеостаз. Доказана роль микрофлоры в активации специфического клеточного и гуморального иммунитета, а также в стимулировании неспецифической резистентности организма. Сформировавшийся микробиоценоз кишечника активирует продукцию IgA и секреторного IgA, фагоцитарную активность макрофагов и нейтрофилов, стимулирует созревание лимфоидного аппарата, потенцируя продукцию интерферона и лизоцима [9,10].

Влияние НР инфекции на изменение микробиоты желудка и кишечника изучалось у животных и человека. Культуральный метод, примененный Y.N. Yin и соавт. показал прирост *Enterococcus* spp. и *Staphylococcus aureus* в ЖКТ, а также снижение *Lactobacillus* spp. после инфицирования НР у монгольских песчанок [11]. Также, было изучено, что у носителей НР наблюдается низкое разнообразие микроорганизмов в фекальных образцах вследствие уменьшения числа анаэробов. В сравнении с НР-негативными у НР-позитивных пациентов было обнаружено увеличение числа *Clostridium* spp [12].

A. Bühling и соавт. в своем исследовании показали уменьшение микробного разнообразия в кишечнике у НР-позитивных пациентов за счет снижения общего количества анаэробов. Наблюдалось также уменьшение *Enterobacteriaceae* spp., *Clostridium innocuum* и *Veillonella* spp., которые являются важной составляющей нормальной кишечной микрофлоры. Помимо этого отмечено незначительное снижение числа *Bifidobacterium* spp., *Enterococcus* spp., *Lactobacillus* spp. у НР-позитивных пациентов. Аналогичные результаты были получены Y.J. Yang с соавт., которые наблюдали уменьшение числа *Bifidobacterium* spp. и соотношения *Bifido bacterium* spp. и *E. coli* у пациентов, инфицированных НР [12].

### **1.4. Эрадикационная терапия направленная на *Helicobacter pylori***

НР является основным этиологическим фактором гастродуоденальной патологии. При длительном персистировании НР у человека развивается хронический воспалительный процесс в слизистой оболочке,



сопровождающийся дисрегенераторными изменениями эпителия. Этапы «каскада Correa» — атрофия, кишечная метаплазия и дисплазия — сегодня рассматриваются как предраковые изменения слизистой оболочки желудка, т.е. морфологические изменения с высоким риском трансформации в рак желудка. Успешная эрадикация предупреждает развитие неопластической трансформации эпителия.

Обязательным показанием к эрадикационной терапии являются; язвенная болезнь, MALT – лимфома, атрофический гастрит, состояние после резекции по поводу рака желудка, пациенты имеющие I степень родства по отношению к больным раком желудка [65].

Лечение инфекции основывается на комбинации антибактериальных препаратов и ингибиторов протонной помпы, которые способствуют понижению pH желудка и обладают антисекреторными свойствами которые необходимы для бактерицидного действия противомикробных препаратов. Эффект действия препаратов зависит не только от их фармакологической активности, но и от их фармакокинетических свойств. Многие антибактериальные средства, включая амоксициллин, кларитромицин, левофлоксацин, метронидазол, тетрациклин, рифабутин и висмутсодержащие соединения, были использованы для терапии НР, в то время как основными антисекреторными являются ИПП [66].

Эффект большинства антибиотиков, используемых для лечения НР, включая кларитромицин, левофлоксацин и метронидазол, зависит от концентрации. Их эффективность пропорциональна их концентрации в плазме [64-66]. В случае кларитромицина точкой приложения является, предложенная для восприимчивых штаммов, составляет 0,25 мкг / мл, а для резистентных штаммов > 0,5 мкг / мл [67], тогда как для левофлоксацина и метронидазола является предложенные для резистентных штаммов, составляют > 1 мкг / мл И > 8 мкг / мл, соответственно, как определено Европейским комитетом по тестированию антимикробной чувствительности [68]. В отличие от влияния концентрационно-зависимых антибиотиков, бактерицидное действие амоксициллина на НР зависит от времени, то есть его эффективность пропорциональна времени, в течение которого концентрация в плазме выше максимума [69-71], И контрольная точка, предложенная для резистентных штаммов, обычно > 0,5 мкг / мл, хотя более строгая контрольная точка (> 0,12 мкг/мл) была определена Европейским комитетом по тестированию антимикробной чувствительности на резистентность НР к амоксициллину [69]. Многие соли висмута плохо растворяются в воде и поэтому очень слабо абсорбируются и, таким образом, проявляют свою активность при местном действии в желудочно-кишечном тракте. Сообщается, что концентрация висмута для предотвращения роста *H. pylori* составляет от 4 до 32 нг / л [72]. Пост-антибиотический эффект против *H. pylori* был продемонстрирован для кларитромицина и левофлоксацина [73-74].

С точки зрения устойчивости изменение свойств пенициллин-связывающего белка, либо снижение приверженности к амоксициллину [75],

либо точечная мутация в гене *rbr1A* [76], являются основным механизмом, приводящим к устойчивости амоксициллина к *H. pylori*. Другие механизмы устойчивости к амоксицилину могут включать пониженную проницаемость мембраны, приводящую к низкому накоплению амоксициллина [77]. Для кларитромицина основным механизмом резистентности является точечная мутация в гене 23S рРНК, наиболее часто встречающаяся у A2143G (69,8%), за ней следуют A2142G (11,7%) и A2142C (2,6%). Точечная мутация *gyrA*, кодирующая ДНК-гиразу, в кодонах, кодирующих аминокислоты 87, 88, 91 или 97, наблюдалась в устойчивых к левофлоксацину изолятах. Для метронидазола в резистентных к метронидазолу штаммах *H. pylori* идентифицированы нулевые мутации в гене *rdxA*, который кодирует нечувствительную к кислороду нитроредуктазу NADPH (RdxA). Другие гены, такие как *frxA* (кодирующие оксидантоказу NADPH flavin) и *fdxB* (кодирующие ферредоксинподобный фермент), также играют роль в механизмах устойчивости к метронидазолу. Для Рифабутина мутанты *H. pylori* с мутациями в кодонах 524-545 или кодоне 585 гена *gro* устойчивы к рифабутину [78-85].

Сопrotивление *H. pylori* солям висмута редко [86], и сообщалось, что коллоидный субцитрат висмута предотвращает развитие резистентности НР к метронидазолу [87].

Хотя антагонисты  $H_2$ -рецептора могут использоваться в качестве антисекреторных средств, ИПП являются более эффективными. ИПП ингибируют насос желудочной кислоты ( $H^+ / K^+$  АТФаза), который отвечает за секрецию соляной кислоты и расположен в канальцевой мембране желудочных париетальных клеток [88]. При низком рН ИПП протонируются, затем подвергаются циклизации с образованием тетрациклического сульфонида, который необратимо связывается с цистеинами в  $\alpha$ -субъединице  $H^+ / K^+$  АТФазы и ингибирует  $H^+ / K^+$  АТФазу [89]. Таким образом, накопление и начало действия ИПП зависят от их константы кислотной ионизации ( $pK_a$ ), с более высоким  $pK_a$ , что обеспечивает более высокую конверсию в активный сульфонида. Из ИПП рабепразол имеет самый высокий  $pK_a$  ( $pK_a = 4,9$ ), за ним следуют омепразол ( $pK_a = 4,13$ ), лансопразол ( $pK_a = 4,01$ ) и пантопразол ( $pK_a = 3,96$ ) [90].

Большинство ИПП в основном метаболизируется печеночными ферментами цитохрома P450 CYP2C19 и CYP3A4. Таким образом, их фармакологические эффекты находятся под влиянием эндогенного (например, фармакогенетического полиморфизма) и экзогенного (например, взаимодействия лекарственного средства) факторов. Известно, что генотип CYP2C19 влияет на фармакокинетические свойства ИПП. Соотношения периода полураспада ( $t_{1/2}$ ) в слабых метаболиторах CYP2C19 и метаболитов в экстенсивных метаболитах (ЭМ) составляют 2,2, 2,1, 1,9 и 1,4 для омепразола, (-)пантопразола, лансопразола или рабепразола соответственно, и соответствующие отношения площади под кривой (AUC) составляют 7,4-6,3, 10,7-2,5, 4,3-1,9 и 1,8-1,2 [46-51]. Хотя большинство ИПП используют в виде рацемических смесей двух оптических изомеров, на рынке имеется

эзомепразол, S-изомер омепразола, и исследование *in vitro* показало, что по сравнению с омепразолом он метаболизируется в большей степени с помощью CYP3A4 и в меньшей степени CYP2C19, и что сам эзомепразол в основном метаболизируется CYP3A4. Однако у пациентов, получающих эзомепразол, генотип CYP2C19 по-прежнему играет важную роль в ингибирующем кислото эффекте и эрадикации НР, и это также относится к пациентам, принимающим декслансопразол, R-изомер лансопразола [90-93].

Хотя антибиотики являются основными в схеме применяемыми в терапии инфекции НР, развитие резистентности ограничивает их применение. Кроме того, введение антибиотиков нарушает микробиоту, микроорганизмы, которые колонизируют желудочно-кишечный тракт человека, и таким образом вызывают побочные эффекты, такие как диарея. Из-за этого, альтернативные методы лечения, включая использование пробиотиков, которые снижают частоту побочных действий во время приема антибактериальной терапии и использованы для эффективности эрадикации инфекции *H. pylori*.

Пробиотики - это живые организмы, которых применяют перорально, чтобы принести пользу. В последние годы применение пробиотиков в лечении инфекции *H. pylori* стало активной исследовательской областью. Несколько пробиотиков, включая *Saccharomyces boulardii* (*S. boulardii*) и штаммы *Lactobacillus*, были объединены с антибактериальными терапиями для лечения инфекции. По сравнению со стандартной тройной терапией, хотя добавление *S. boulardii* значительно уменьшало частоту ассоциированной с антибиотиком диареи, оно не приводило к существенному улучшению частоты эрадикации *H. pylori* [94-96]. Аналогично, добавление *Lactobacillus GG* значительно уменьшало частоту диареи, но не улучшало эффективность эрадикации тройной терапии [94,95]. Сообщалось, что добавление *Lactobacillus acidophilus* значительно улучшает эффективность эрадикации тройной терапии [97], но в другом исследовании добавление комбинации *Lactobacillus acidophilus* и *Bifidobacterium lactis* не показало улучшения в эрадикации НР [94]. Интригуяюще, в отличие от пробиотических препаратов на основе капсулы саше, известно, что ферментированные пробиотики на основе фермента улучшают эффективность эрадикации НР примерно на 5-15% [98], возможно, потому, что некоторые из них содержат дополнительные компоненты (например, лактоферрин и гликомакропептид), которые могут ингибировать НР.

Согласно действующим рекомендациям, стандартная тройная терапия, содержащая ИПП и два антибиотика, кларитромицин и амоксициллин / метронидазол, является схемой первой линии для лечения инфекции *H. pylori* [99-101]. Рекомендуемая терапевтическая продолжительность стандартной тройной терапии составляет 7 дней в Европе и Азии, 10-14 дней в Соединенных Штатах. Хотя тройная терапия считается стандартной терапией первой линии, самые последние данные показывают, что эффективность стандартной тройной терапии снижается и что частота эрадикации стандартной тройной терапии в некоторых областях составляет менее 80% [79,103]. Чтобы улучшить скорость эрадикации тройной терапии, Furuta с соавторами [104]

предложили индивидуальный режим, основанный на генотипе CYP2C19 и бактериальной восприимчивости к кларитромицину, и показал 96% эффективность лечения. Хотя эта стратегия на основе фармакогеномики является многообещающей, она требует тестирования генотипов заранее, а экономическую эффективность еще предстоит проверить. Альтернативно, новая версия Маастрихтского протокола V консенсуса [3] обновила рекомендации по терапии первой линии, и четверная терапия, содержащая висмут, была официально заменена стандартной тройной терапией в тех областях, в которых степень резистентности к кларитромицину превышает 15-20%. Однако из-за побочных эффектов висмут больше не доступен во многих странах, включая Японию, Малайзию и Австралию, и в результате висмута содержащая терапия не используется в этих областях, поэтому последовательное лечение или применение висмут относится к квадротерапии которое рекомендуется в качестве альтернативного лечения первой линии в области высокой устойчивости к кларитромицину.

В 2000 году была предложена десятидневная последовательная терапия с частотой эрадикации 98% [106]. Он состоит из 5-дневной двойной терапии (ИПП плюс амоксициллин), затем 5-дневная тройная терапия [ИПП плюс кларитромицин и нитронидазол (метронидазол или тинидазол)]. По сравнению с 7-й стандартной тройной терапией последовательная терапия приводила к более высоким скоростям эрадикации (92% против 75%). [107].

Мета-анализ 10 рандомизированных контролируемых исследований с 3011 пациентом рассчитали эффективность эрадикации 91,0% (95% ДИ: 89,6-92,1) для последовательной терапии и 75,7% (95% ДИ: 73,6-77,7) для стандартной тройной терапии [108]. Используя предложенную классификацию, последовательная терапия оценивалась как В или хорошая, тогда как стандартная тройная терапия оценивалась только как F или неприемлемая. Поэтому последовательная терапия рекомендуется в качестве альтернативы стандартной тройной терапии инфекции НР [75-78]. Тем не менее, исследование, проведенное на 7 латиноамериканских сайтах, показало, что 14 дневная тройная терапия превосходила 10-дневную последовательную терапию при эрадикации НР [108], предполагая, что применение последовательной терапии в качестве терапии первой линии все же требует вариации в определенных областях.

По результатам метаанализа рандомизированных контролируемых исследований, проведенных в течение 1998 и 2007 годов, показали, что сочетанная четырехкомпонентная терапия превосходит стандартную тройную терапию с точки зрения намеренного лечения и протокола [109]. По сравнению с последовательной терапией сопутствующая четырехкомпонентная терапия была продемонстрирована как безопасная и столь же эффективная для эрадикации инфекции НР [110], и такое же исследование показало, что двойная устойчивость к кларитромицину и метронидазолу не влияла на скорость эрадикации сопутствующей четырехкратной терапии, но значительно влияла на последовательную терапию.

Эрадикация инфекции НР очень важна из-за ее высокой распространенности. Комбинация антисекреторных и противомикробных препаратов были предложены в качестве терапии первой линии или второй линии для ее лечения. Однако результат лечения зависит от многих факторов, включая желудочную кислотность и устойчивость к антимикробным агентам. В то время как кислотность можно контролировать с помощью ИПП, устойчивость к различным антимикробным агентам увеличивается. Из-за часто используемых антибактериальных препаратов для лечения инфекции НР, устойчивость к амоксициллину обычно низкая. Кроме того, хотя клиническое применение альтернативных лекарств еще предстоит оценить, применение пробиотиков в комплексной эрадикационной терапии могут обладать потенциалом для обеспечения аддитивного или синергического действия против НР, поскольку они оказывают различное воздействие.

### **1.5. Изменения состава кишечной микробиоты на фоне приема эрадикационной терапии**

Бактериологические и молекулярно-генетические методы исследования позволили изучить изменения состава кишечной микробиоты на фоне назначения эрадикационной терапии. Установлено, что у пациентов, принимавших амоксициллин, происходило увеличение числа *Enterococcus* spp., *Enterobacteriaceae* spp. и *Peptostreptococcus* spp. Количество представителей анаэробной микрофлоры *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp. значительно уменьшалось. Кроме того, у данных пациентов были обнаружены дрожжи *Candida albicans*. У пациентов, получавших кларитромицин, также отмечалось снижение количества *Bifidobacterium* spp., *Clostridium* spp., *Bacteroides* spp. и повышения числа *Enterococcus* spp. При этом в группе амоксициллина состав микрофлоры восстанавливался через четыре недели после завершения терапии, а во второй группе кларитромицина уменьшенное количество *Bifidobacterium* spp. и *Bacteroides* spp. сохранялось [13].

Не смотря на то, что взаимосвязь между НР инфекцией и изменением желудочной и кишечной микробиотой до сих пор дискутируется, многочисленные исследования показали, что как НР инфицирование, так и терапия, направленная на ее эрадикацию, могут привести к изменениям состава микробиоты кишечника, характеризующийся с одной стороны снижением разнообразия микроорганизмов, уменьшением числа облигатных анаэробов, преобладающих в норме и необходимых для нормального функционирования ЖКТ, а с другой стороны увеличением числа факультативных аэробных микроорганизмов. Более того, антибиотикотерапия вызывает появление антибиотикорезистентных штаммов среди представителей нормобиоты, что может усугубить распространение факторов резистентности в ее сообществе [12].

В связи с вышеизложенным особый интерес представляет возможность использования пробиотиков, которые способствуют восстановлению нормальной микрофлоры кишечника и, следовательно, улучшению качества

иммунного ответа микроорганизма и местной иммунной реактивности слизистой оболочки ЖКТ. Необходимо отметить, что в отчете Маастрихт IV во 2 части «Диагностика и лечение инфекции *H. pylori*» (Утверждение 12) указано следующее: «некоторые пробиотики и пребиотики, используемые в качестве дополнительных препаратов, демонстрируют многообещающие результаты (снижение частоты побочных эффектов). Лактоферрин используется для улучшения результатов лечения *H. pylori*. Два мета-анализа показали, что лактоферрин повышает эффективность трехкомпонентной терапии, включающей ИПП и кларитромицин. Однако следует учитывать невысокое качество многих исследований и ограниченное число 11 центров проведения исследования. Мета-анализы исследований по использованию лактобактерий гетерогенны, поскольку в них применялись различные виды и штаммы. Необходимы дополнительные исследования для определения штамма, дозы и способа применения. Обнадеживающие результаты получены в мета-анализе по использованию *Saccharomyces boulardii* в качестве дополнения к трехкомпонентной терапии (отношение шансов 0,46; доверительный интервал 95%, 0,3-0,7). Установлено что *Saccharomyces boulardii* достоверно снижают риск антибиотикоассоциированной диарей на 53% и увеличивает успешность эрадикации на 13%. [13, 14, 15, 19].

Добавление пробиотиков при хеликобактерной терапии обладает протективным действием на состояние кишечной микрофлоры и помимо того что снижается побочные эффекты от приема антибактериальной терапии происходит более быстрая клиничко-эндоскопическая ремиссия заболевания и увеличивается эффективность эрадикации *H.pylori*. Пробиотики оказывают влияние *H. pylori* в желудке вследствие антагонистического действия и стимуляции местной иммунологической защиты. Таблица 1. [20,21,22].

В одном из исследований при использовании в качестве монотерапии пробиотика из молочнокислых бактерии у пациентов с хроническим гастродуоденитом *H.pylori* ассоциированным в стадии обострения успешность эрадикации была достигнута 48%. Другими авторами опубликована работа в котором при получении данных было выявлено, что использование *L. Acidophilus* в качестве вспомогательной терапии привело к эрадикации НР у 6 из 14 пациентов. [23].

Таблица 1 - Опыт применения пробиотиков для достижения эрадикации *Helicobacter pylori* [20,21,23,24,25,26].

Пробиотики в составе комплексной эрадикационной терапии	Пробиотики в качестве монотерапии
<i>Bacillus clausii</i> (E.Nista и соавт., 2004)	<i>Lactobacillus salivarius</i> (Y.Aiba, 1998)
<i>Lactobacillus casei</i> (A.Tursi и соавт., 2004; J.Sykora и соавт., 2005)	<i>Lactobacillus johnsonii</i> LA1, <i>L. casei</i> YIT 9029, <i>Lactobacillus amylovorus</i> DCE 471 (L.Avonts и соавт., 2001)

Продолжение таблицы 1

Lactic acid bacteria (E.Plewinska и соавт., 2005)	Lactobacillus gasseri (I.Sakamoto и соавт., 2001)
B. subtilis (Е.И.Ткаченко и соавт., 2005, 2006; S.Park и соавт., 2007)	L. acidophilus (F.Canducci и соавт., 2002)
Bifidobacterium (Е.И.Ткаченко и соавт., 2004)	L. acidophilus, L. casei, Lactobacillus bulgaricus, Streptococcus thermophilus (C.Wendakoon и соавт., 2002)
Lactobacillus spp. (A.Armuzzi, F.Gremonini и соавт., 2005; D.Lesbros-Pantoflickova и соавт., 2007)	E. faecium (В.И.Симаненков и соавт., 2004; Е.И.Ткаченко и соавт., 2006)
E. faecium (В.И.Симаненков и соавт., 2004; Е.И.Ткаченко и соавт.,2006)	S. boulardii (Y.Vandenplas и соавт., 2005; H.Szajewska и соавт., 2010)
Bifidobacterium animalis, L. casei (C.Goldman и соавт., 2006)	B. subtilis (Ю.П.Успенский и соавт., 2013)

На сегодня остаётся в перспективе в качестве вспомогательной терапии во время эрадикации применение Lactobacilli spp., потому что Bifidobacteria spp., выделяют бактериоцины, которые ингибируют рост *H. pylori* а так же нарушают адгезивную способность микроба к клеткам желудка. Результаты последних исследований показали, что дополнительные назначения пробиотических штаммов (*Saccharomyces boulardii*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecium* и *Streptococcus faecium*) к стандартной эрадикационной терапии улучшает комплаентность, снижает частоту и выраженность побочных эффектов (дисбиоз кишечника, антибиотик-ассоциированная диарея), повышает эффективность эрадикации микроба за счет прямого антагонистического влияния на *H. pylori* и повышения иммунного ответа организма человека результаты исследования приведены в таблице 2. [27,28,29,30].

Таблица 2 - Оценка эффективности эрадикации *H. pylori* у больных *H. pylori* ассоциированными заболеваниями при использовании различных схем терапии (стандартная эрадикационная терапия в комплексе с пробиотиками): при оси абсцесс-варианты лечения: при оси ординат- эффективность эрадикации *H. pylori* %.

Варианты лечения	Эффективность эрадикации <i>H. pylori</i>
<i>Enterococcus faecium</i> L-3	75%
<i>Bacillus subtilis</i> ,	72%
<i>Lactobacillus gasseri</i> PA 16/8, <i>Bifidobacterium bifidum</i> MF 20/5, <i>Bifidobacterium longum</i> SP 07/3	82%

Без пробиотика	61%
----------------	-----

По данным исследований характерно, что применения пробиотиков во время эрадикации является эффективным. Пробиотики оказывают положительную динамику особенно содержащие лактобациллы и бифидобактерии [31].

### 1.6. Антогонизм микроорганизмов толстого кишечника

Количество микроорганизмов в толстом кишечнике составляет  $10^{10}$ - $10^{11}$  КОЕ на 1 г фекалии, в составе огромное количество резистентной микрофлоры (более 500 видов, 45 родов, 17 семейств)[32,33, 34,35].

В целом микрофлора кишечника подразделяется на облигатную, факультативную, транзиторную (случайную, остаточную). На протяжении всей своей жизнедеятельности у здорового человека преобладают анаэробные бактерии (90-95%): это бифидобактерии, бактероиды, лактобациллы, фузобактерий, эубактерии, пептострептококки, клостридии. От 5 до 10% микрофлоры толстого кишечника составляют аэробы: эшерихии, стафилококки, энтерококки, и другие условно – патогенные микроорганизмы такие как (протей, энтеробактер, цитробактер) а так бактерии неферментирующие (псевдомонады, ацинетобактер), и грибы рода Кандида [36-41].

Большая часть бактерии расположена пристеночно и называется мукозная микрофлора. И покрывает кишечник тоненькой пленочкой образуя микробный дерн и способствует первичным барьером от чужеродных микроорганизмов, тем самым обеспечивая нормальный метаболический процесс в колоноцитах толстого кишечника [34,41].

В таблице 3 указаны качественный и количественный состав нормальной микрофлоры толстого кишечника у здоровых лиц.

Таблица 3 - качественный и количественный состав нормальной микрофлоры толстого кишечника у взрослых здоровых лиц (КОЕ/г фекалий) по данным Котовой А.Л.

№	Показатели	Норма
1	Бифидобактерии	$10^9$
2	Лактобактерии	$10^9$
3	Бактериоиды	$10^7$
4	Фузобактерии	
5	Эубактерий	
6	Пептострептококки	
7	Вейлонеллы	
8	Клостридии	$10^3$
9	Энтеробактерии	$10^8$



### Продолжение таблицы 3

10	Условно-патогенные	10 <sup>3</sup>
11	Неферментирующие грамотрицательные палочки	

Основные функции облигатной микрофлоры кишечника, защитная, от проникновения микробов и токсических веществ. Она образует в процессе органические жирные кислоты, которые в последствии выполняют антагонистическую функцию по отношению к условно – патогенным микроорганизмам. Основные бактерии которые обладают антагонизмом это бифидумбактерии и лактобактерии. В кишечнике человека существует более 60 штаммов бифидумбактерии которые подразделяются и могут продуцировать белковоподобные антимикробные соединения и ассоциированные с бактериоциноподобными субстанциями. 6 штаммов бифидобактерии обладают выраженной антимикробной активностью. Антагонистический эффект был обусловлен синтезом термостабильных белковоподобных компонентов, чувствительных к протеазе [34,37].

Так же наблюдалось, что эти 6 штаммов бифидумбактерий ингибируют рост *H.pylori*. и участвуют в активации пристеночного пищеварения, также синтезируют белки, аминокислоты, витамины. У здоровых лиц нормальная микрофлора кишечника способствует синтезу витаминов группы В, С, К, фолиевой, никотиновой кислоты, аминокислот, липидных соединений и усилению процессов всасывания через стенку кишечника ионов кальция, железа, витамина В12, D и в регуляции кроветворения, также участию в гидролизе клетчатки и в конъюгации желчных кислот. Детоксицирующая функция заключается в уменьшении проницаемости сосудисто- тканевых барьеров для патогенной микрофлоры кишечника, выводит из организма болезнетворные и токсичные вещества, а также обладает иммуномодулирующим действием: регуляция гуморального и клеточного иммунитета, стимуляция синтеза иммуноглобулинов, L-интерферона, интерлейкина 1 и фактора некроза опухолей (TNF), что способствует препятствию онкологических заболеваний. Стимуляция биологически активных веществ таких как аминომасляная кислота, медиатора, аланин, 5аминовальериановая кислота положительно влияют на функцию ЖКТ (желудочно-кишечный тракт), печени, ССС (сердечно сосудистую систему) и систему кроветворения[36-41].

#### **1.7. Методы диагностики нарушения кишечной микрофлоры**

Диагноз дисбактериоза кишечника выставляется на основании клинических данных, уменьшения количества облигатной микрофлоры и превалирования условно - патогенных микроорганизмов в силу различных факторов. Диагноз дисбактериоз кишечника подтверждается на основании клинической картины, лабораторных методов исследования

(бактериологических и серологических). Производится первичный посев кала количественным методом. В посевах кала обнаруживается обилие роста условно-патогенных бактерий, таких как, *Staphylococcus aureus*, дрожжеподобных грибов *Candida*, *Proteus*, лактозонегативных эшерихий и др[31].

Для лабораторной диагностики дисбактериоза кишечника в основном используют бактериологический метод исследования, который проводится в течении пяти-семи дней и более на специальных подготовленных средах. У здорового человека в микрофлоре кишечника насчитывается более 395 различных групп микроорганизмов. Но при использовании бактериологического метода можно выявить не более 25-30 факультативных микроорганизмов и примерно 120 условно-патогенных бактерии при наличии селективных питательных сред [32].

Эффективность диагностики данного метода непосредственно зависит от качества используемых питательных сред. В связи с тем, что микрофлора испражнений отражает микробный спектр толстого кишечника, в качестве исследуемого материала используют фекалии. Исследуются испражнения больных (5-10 г), для сбора испражнений используют специальную стерильную герметичную посуду, в которую кладется специальная стерильная бумага для защиты материала от возможных воздействия дезрастворов. Необходимая для взятия фекалии посуда должна выдаваться микробиологической лабораторией. Собранный материал немедленно доставляется в лабораторию и до того момента пока будет произведен посев, хранится в холодильнике, но не более 2 ч. Нельзя собирать испражнения вечером и при этом хранить в холодильнике. Особенно важно производить сбор материала до начала антибактериального лечения для чистоты результатов исследования[32].

Поступивший материал разводят стерильным нейтральным физиологическим раствором из расчета 1:10 (вес/объем). Материал переводят в гомогенизированную субстанцию. Таким образом, производят первое 1:10 разведение, затем еще раз десятикратное разведение. Для обнаружения бифидобактерий просматривают пробирку со средой Блаурокка и просматривают наличие роста культуры в разведениях. Через двое суток в агазированной питательной среде в определённых разведениях возможны отдельные макроколонии в виде «гвоздиков». При наличии роста культуры производят мазки, с последующей подсушкой на воздухе с фиксацией на пламени горелки, к каждому мазку добавляется капля спирта 96 % и поджигается. После охлаждения мазки окрашивают по Граму. Результат подсчитывают по последнему разведению, в котором наблюдался рост бифидобактерии[32,33].

Лактобациллы обнаруживаются через сутки после посева, наличие роста отмечается в определенных разведениях. Наблюдается макроколонии в виде зернышек. Из пробирок с ростом культур окрашивают по Граму и микроскопируют. Энтеробактерии производят выделением на средах Эндо, Плоскирева, Левина и кровяном агаре. На чашку Петри на выше описанные

среды высеивают по 0,1 мл из разведения  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  и  $10^{-7}$  и растирают шпателем. Для выявления анаэробной микрофлоры рекомендуется разводить испражнения физиологическим раствором в 10 раз. Из этого основного разведения делают ряд последующих (1 : 100, 1 : 1000, 1 : 10000, 1 : 100000). Из последнего разведения делают посеы по 0,1 мл на среды Эндо, Плоскирева, Левина, Сабуро кровяной агар и др. Количество кишечной палочки и других микробов в 1 г фекалий определяют по числу колоний, выросших на специально подготовленных питательных средах с дальнейшим подсчётом на количество посеянного материала и степень его разведения[31-33].

## ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 2.1 Клиническая характеристика пациентов

Набор пациентов проводился на базе ГКП на ПХВ «Городская поликлиника №3» г. Астана. Все пациенты подписывали информационное согласие на участие в клиническом исследовании. В общей сложности было обследовано 127 пациентов, из них у 61 пациента *H. pylori* был подтвержден двумя методами диагностики.

Было исследовано 61 пациент с синдромом гастралгии и диспепсии, проведено ЭГДС с использованием ХЕЛПИЛ теста для экспресс-диагностики инфекции *H. pylori* и экспресс stool-тест на наличие антигена *H. pylori* в кале. Пациентам выставившим диагноз на основании инвазивного метода ЭГДС с определением *H. pylori* экспресс ХЕЛПИЛ тестом были дополнительно обследованы с использованием неинвазивного stool-тест на наличие антигена *H. pylori* в кале в течении 3 дней после проведенного ЭГДС. (Рисунок 1). Учитывая данные двух методов диагностики был выставлен диагноз хронический гастрит *H. pylori* ассоциированный.

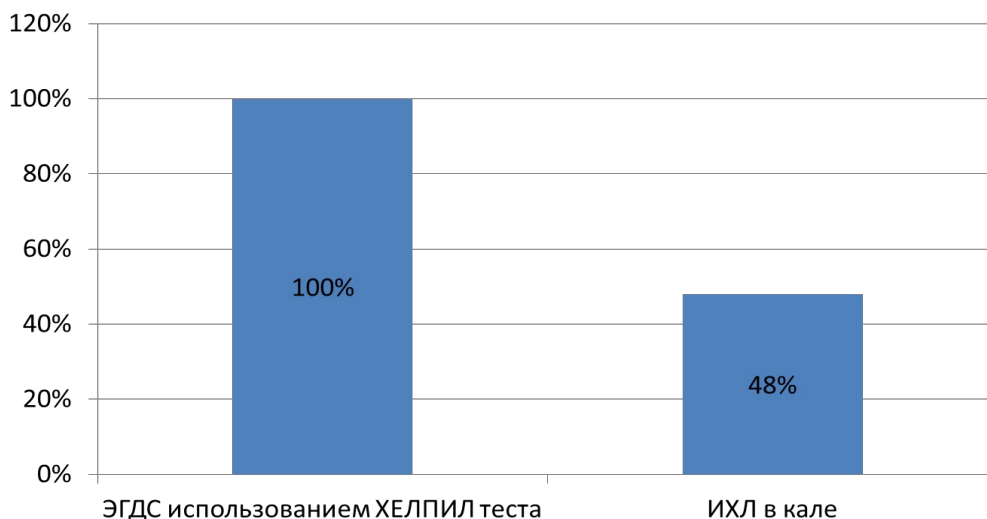


Рисунок 1 – Данные двух методов диагностики на наличие *Helicobacter pylori*.

Возраст пациентов составил от 17 до 48 лет. Средний возраст больных составил  $23 \pm 1,5$ , из них 51(83,7%) женщин и 10 (16,3%) мужчин (таблица 1). Перед назначением эрадикационной терапии пациенты были направлены в Центр санитарно-эпидемиологической экспертизы для сдачи анализа на бактериологическое исследование толстого кишечника. После оценки результатов кишечной микробиоты пациенты активно вели анкету которая состояла из паспортных данных, анамнеза, а так же клинических жалоб до, во время и после эрадикации.

Эрадикационная терапия проводилась в течении 10 дней с использованием ингибитор протоновой помпы (нольпаза 40 мг по 1 таб х 2 раза в день в течении 15 дней), двух антибиотиков (флемоксин салютаб 1000 мг по 1 таб х 2 раза в

день, фромилд 500 мг по 1 таб х 2 раза в день) согласно IV Маастрихтскому консенсусу.

В течении 10 дней после проведенной терапии пациенты сдавали повторно анализ на дисбактериоз для оценки влияния эрадикационной терапии на состав кишечной микробиоты у разных групп с применением и без применения пробиотиков. Для оценки успешности эрадикационной терапии использован неинвазивный stool-тест на наличие антигена *H. pylori* в кале в течении 4 недель после окончания эрадикации.

Таблица 4 - Характеристика пациентов участвующих в исследовании

Характеристики	n	%	Возраст, средний возраст ± m
Пол			
• Женский	51	83,7%	23 ±1,5
• Мужской	10	16,3%	

Основные требования включения пациента в исследование:

Основные требования включения пациента в исследование: отсутствие сопутствующей патологии, лица не принимавшие за 4 недели до исследования ингибиторов протоновой помпы, H<sub>2</sub> –блокаторов, антацидов, антибактериальной терапии.

Критерии исключения: лица страдающие воспалительными заболеваниями кишечника ВЗК (язвенный колит, болезнь Крона), синдромом мальабсорбции, хронический панкреатит с внешнесекреторной недостаточностью, с сахарным диабетом, долихосигма, дивертикулы кишечника, недостаточность баугиновой заслонки (илеоцикального клапана), наличие стриктур, спаечного процесса, цирроз печени, глистные инвазии.

Пациент не участвует в исследовании, если за две три недели до начала исследования принимал антацидные средства, антибиотики, ингибиторы протоновой помпы. Для чистоты за неделю до исследования не рекомендовалось кушать продукты, увеличивающие газообразование — горох, фасоль, картофель, чёрный хлеб и прочее.

В общей сложности  
обследовано 127  
пациентов



1. Клиническое исследование пациентов (сбор анамнеза жизни, анамнеза заболевания, объективный осмотр).
2. Инвазивный метод ЭГДС с определением *H. pylori* экспресс ХЕЛПИЛ тестом.
3. Неинвазивный иммунохроматографический тест системы PreventID для определения антигенов *H. pylori* в кале (экспресс тест)
4. Посев кала на дисбактериоз.



Первая группа - 21 пациент: во время проведения эрадикационной терапии принимали оригинальный препарат «Бифиформ».



Вторая группа- 20 пациентов: во время проведения эрадикационной терапии принимала биологически активную добавку «Ультрабиотик».



Третья (контрольная группа)- 20 пациентов, во время проведения эрадикационной терапии пробиотические препараты не были использованы



1. Клиническое исследование пациентов (сбор анамнеза)
2. Посев кала на дисбактериоз.
3. Неинвазивный иммунохроматографический тест системы PreventID для определения антигенов *H. pylori* в кале (экспресс тест).



Сравнительный анализ по группам.

Рисунок 2 - Дизайн исследования экспериментальное, контролируемое исследование.

## 2.2 Методы исследования

### 2.2.1 ЭГДС с использованием ХЕЛПИЛ теста для экспресс-диагностики инфекции *H. pylori*

До проведения эрадикационной терапии пациенты проходили ЭГДС с тест-системой хелпил. Тест-система ХЕЛПИЛ -это одноразовое устройство для инвазивной экспресс-диагностики инфекции *Helicobacter pylori* по уреазной активности биоптата, полученного в ходе эндоскопического обследования слизистой оболочки желудка и двенадцатиперстной кишки(Рисунок 3).

В основе действия тест-системы ХЕЛПИЛ лежит биохимический метод определения бактерии *Helicobacter pylori* по активности фермента уреазы. Биоптат помещается на индикаторный диск тест-системы. Появление пятна в течение трех минут свидетельствует о высокой уреазной активности биоптата.



Рисунок 3- Тест-система ХЕЛПИЛ

Из всех возможных уреазопроductентов именно *Helicobacter pylori* обладает такой уреазной активностью, которая за несколько минут приводит к изменению цвета индикаторного диска.










№	В момент помещения биоптата	Спустя 3 минуты с момента помещения биоптата			Результат
		Лицевая сторона	Обратная сторона	Лицевая сторона, биоптат снят	
1.					высокая уреазная активность НР +
2.					невысокая уреазная активность НР +
3.					отсутствие уреазной активности НР -

Рисунок 4 – Оценка результатов тестирования тест-системы ХЕЛПИЛ

В ходе обследования может быть использован следующий биоматериал:

- биоптат любого отдела желудка;
- биоптат луковицы двенадцатиперстной кишки.

Размер биоптата должен быть не менее 2 мм (Рисунок 4)

Чувствительность тест-системы ХЕЛПИЛ составляет 93-95%, специфичность 92-94%.

### 2.2.2 Иммунохроматографический экспресс-тест определения антигенов *H. pylori* в кале

После проведения ЭГДС с использованием экспресс-диагностики для определения инфекции *Helicobacter pylori* по уреазной активности биоптата (тест-системы ХЕЛПИЛ) пациенты дополнительно для подтверждения диагноза хронического гастрита *H. pylori* ассоциированный, проходили неинвазивную диагностику с помощью иммунохроматографической тест-системы PreventID для определения антигенов *H. pylori* в кале (экспресс-тест). Этот иммунохроматографический тест используют как с целью первичной диагностики *H. pylori* так и для оценки успешности эрадикации через (4-6 недель). (Рисунок 5)



Рисунок 5 - Иммунохроматографический экспресс- тест .

Забор пробы и ее подготовка: необходимо собрать кал в сухую, чистую пробирку или специальную пробирку с жидкостью (с закрепленной в крышке пробирки палочкой). Анализ должен быть проведен по возможности в течении 2 дней после забора кала. До этого момента пробы должны храниться охлажденными до 2-4 С.

Принцип теста. PreventID H. pylori антиген представляет собой экспресс тест для качественного определения иммунохроматографическим методом H. pylori в кале. Тестовая кассета содержит нанесенные окрашенные антитела против H. pylori , которые связываются с присутствующей бактерией. Образуется антиген-антитело комплекс, который в области тестовой полоски (Т) проявляется штрихом фиолетового-красного цвета. Наличие антигена в кале определяется в течении 10 минут. Внутренним контролем служит контрольная полоска (С): после прохода жидкой пробы в области контрольной полоски(С) наблюдается фиолетово –красный штрих. Наличие этой полоски служит подтверждением тому, что было взято достаточно количество пробы, чтобы проба правильно прошла по кассете и реагенты сработали корректно.

Интерпретация результатов исследования. Положительный результат это появление в окошке двух полосок. Чем выше концентрация антител в пробе тем интенсивней окрашивание тестовой полоски. Отрицательный результат наблюдается при наличии одной полоски в тестовой кассете ( Рисунок 6).

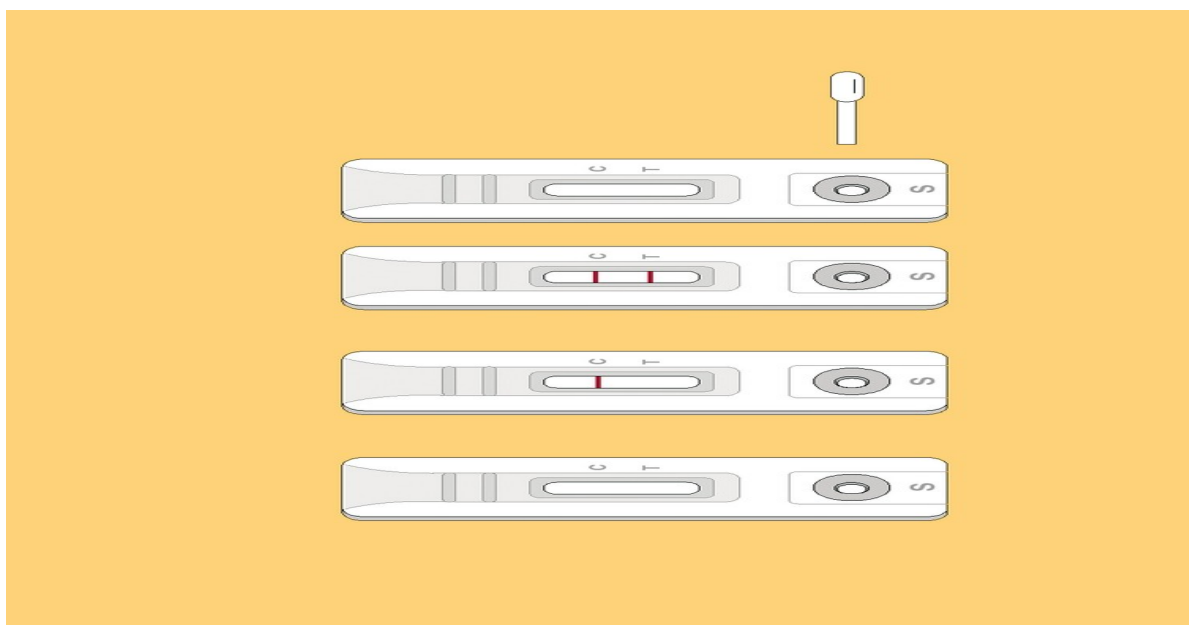


Рисунок 6 - Интерпретация результатов тест системы PreventID для определения антигенов *H. pylori* в кале (экспресс тест).

Недействительно: не появляется в окошке результатов ни одна, результат считается не действительным. Контрольная полоска может не проявиться из-за недостаточного поглощения мембраной раствора пробы. В этом случае тест проводится на другой кассете.

### 2.2.3. Изучение количественного и качественного состава микрофлоры кишечника больных

Для того чтобы оценить нарушения кишечной микробиоты у больных с *H. pylori*- ассоциированным хроническим гастритом до и после эрадикации, и провести сравнительный анализ эффективности пробиотиков в комплексной эрадикационной терапии у больных с *Helicobacter pylori*-ассоциированным хроническим гастритом. Пациентам был произведен первичный посев кала количественным методом на питательные среды в соответствии с нормативными документами[31].

Изучение количественного и качественного состава микрофлоры кишечника больных. Материалом для исследования служат фекалии, которые должны доставляться в лабораторию в стерильном флаконе в количестве 2-3 г, без консерванта в течение 2 часов с момента забора.

В лаборатории фекалии отвешиваются в количестве 1 г в предварительно взвешенный стерильный флакончик, туда же вносится 9 мл стерильного физиологического раствора. В результате получается основное разведение фекалий  $10^{-1}$ . Содержимое флакона тщательно перемешивается стеклянной палочкой и оставляется при комнатной температуре на 10-15 минут. Затем, из надосадочной жидкости готовится ряд разведений по ниже приведенной схеме, от  $10^{-1}$  до  $10^{-8}$ . После этого осуществляется посев материала из разведений на питательные среды для культивирования различных групп микроорганизмов.

Для выделения патогенных энтеробактерий нативный материал жидкой консистенции или разведение плотных испражнений  $10^{-1}$  петлей засеваются на среду Эндо, Плоскирева, висмут-сульфит агар (ВСА) и производится посев 1-2 мл на среды обогащения (магниевую, селенитовую, разлитые в пробирки по 5-7 мл) [31,32].

Из разведения  $10^{-3}$  засеваются 0,1 мл на среду Сабуро с добавлением антибиотика для обнаружения грибов рода кандиды.

Из разведений  $10^{-1}$  и  $10^{-3}$  засеваются по 0,1 мл на желточно-солевой агар (ЖСА) для выявления стафилококков и изучения их лецитиназной активности.

Из разведения  $10^{-3}$  засеваются 0,1 мл в конденсат скошенного мясо-пептонного агара (МПА) по методу Шукевича для обнаружения ползучего роста протей [31-33].

Из  $10^{-3}$  и  $10^{-5}$  разведений засеваются по 0,1 мл на чашку со средой Эндо для выделения условно-патогенных энтеробактерий, а также некоторых НГОБ. Из этих же разведений засеваются по 1 мл в 9 мл среды Вильсон-Блер для обнаружения роста сульфитредуцирующих клостридий.

Для определения гемолитической активности микроорганизмов и для их подсчета осуществляется посев 0,01 мл из разведения  $10^{-5}$  на 5% кровяной агар (КА).

Для количественного определения лактобактерий и энтерококков из разведения  $10^{-5}$  засеваются по 0,1 мл на среды Рогоза или другие среды для культивирования лактобактерий и желточно-солевой агар с ТТТ (ЖСТ) соответственно.

Из разведений  $10^{-6}$  и  $10^{-7}$  засеваются 0,1 мл на кровяной агар с канамицином для выявления роста и количественного подсчета бактериоидов.

Из разведений  $10^{-7}$ ,  $10^{-8}$ ,  $10^{-9}$  по 1 мл засеваются в регенерированную среду Блаурокка или другие среды, рекомендуемые для культивирования бифидобактерий [31-33].

Определение общего микробного числа (ОМЧ) не является информативным, поэтому необходимо произвести подсчет количества и идентификацию конкретных видов микроорганизмов.

Посевы инкубируются при 37°C:

- 1) На средах обогащения до 18 часов;
- 2) На средах Эндо, Плоскирева, 5% КА, МПА с посевом по Шукевичу до 24 часов;
- 3) На ВСА, ЖСА, Блаурокка, ЖСТ – до 48 часов;
- 4) На средах Рогоза, КА с канамицином, Вильсон-Блер – до 72 часов;
- 5) Посевы на среде Сабуро 48 часов инкубируются при 37°C и еще 3 суток при комнатной температуре или все пять суток при 22°C.

**Учет результатов.** В первую очередь необходимо исключить наличие в фекалиях патогенных микроорганизмов семейства Enterobacteriaceae как возможных этиологических агентов инфекционных диарейных заболеваний. Для этого просматриваются первичные посевы на плотных питательных средах

– Эндо, Плоскирева, ВСА и отбираются подозрительные на патогенные энтеробактерии колонии. Параллельно осуществляется высев со сред обогащения на Эндо и ВСА. Дальнейший ход исследования на патогенную флору проводится по общепринятым методикам[31].

На среде Эндо с посевом из разведений  $10^{-3}$  и  $10^{-5}$  производится подсчет и регистрация каждого полученного вида колоний отдельно. Затем снимается не менее двух колоний каждого из видов на среды первичной идентификации (Олькеницкий, Симмонс) для дальнейшего биохимического типирования.

Кровяной агар (КА) позволяет оценить гемолитическую активность микроорганизмов, которые ею обладают, поэтому, в первую очередь, оценивается наличие гемолитической активности, и обязательным является подсчет и регистрация гемолитических форм (грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов) под контролем микроскопии, которая с учетом морфологии позволяет определиться в тактике выбора питательных сред для накопления и окончательной идентификации до вида[32].

Во вторую очередь, наряду с упомянутыми гемолитически активными микроорганизмами изучаются и подсчитываются по аналогии все колонии с различными культуральными особенностями, выросшие на КА.

На кровяном агаре с канамицином изучается рост культур, выросших в анаэробных условиях. Бактероиды на этой среде образуют серовато-белые, прозрачные или мутноватые гладкие с ровными краями колонии, диаметром 1-4 мм. За счет наличия капсулы *V.fragilis* может формировать более сочные и блестящие колонии; *V.avatus* чаще всего образует слизистые колонии, а колонии *V.thetaiotaomicron* обычно белого цвета. С выросших колоний готовятся мазки и окрашиваются по Граму. Морфологически бактероиды являются грамотрицательными полиморфными палочками от коккобацилл до ветвящихся форм. Необходимым тестом является постановка каталазной активности, как правило, бактероиды каталазно-позитивные. Подсчет колоний ведется с учетом морфологии и каталазного теста[33].

На среде Рогоза отмечается рост характерных для лактобактерий колоний (размер 1-3 мм, прозрачные, выпуклые с ровными или изрезанными краями, линзовидные или звездчатые), из которых готовится мазок и окрашивается по Граму; также ставятся каталазный и оксидазный тесты. Лактобактерии в мазке представлены в виде грамположительных палочек, расположенных короткими цепочками, отрицательные по оксидазе и каталазе. На этой среде также растут молочно-кислые бактерии родов *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*. Подсчитывается отдельно количество лактобактерий и других молочнокислых бактерий[31].

На среде ЖСА отмечается наличие типичных по морфологии колоний стафилококка (маслянистые, выпуклые, с ровными краями, блестящие, диаметром 1-3 мм), подсчитывается отдельно количество лецитиназоположительных и лецитиназоотрицательных колоний, которые затем снимаются для дальнейшей идентификации до вида[32].

На среде Сабуро отмечается рост подозрительных на кандиды колоний (сметанообразные, плотной консистенции по всей площади; размеры варьируют от 1-2 мм до 1 см в диаметре; цвет колоний от белого до желтого), из которых готовится мазок и окрашивается по Граму. При обнаружении в мазке грамположительных, неравномерно окрашенных, крупных круглых или овальных, почкующихся клеток применяется метод «врезки» или другие методы, позволяющие определить филаментацию. Они являются обязательными для дифференциации кандид от дрожжей. После этого осуществляется подсчет количества идентичных колоний[31].

Постановка метода «врезки» - из исследуемой колонии набирается петля культуры и врезается в толщу среды Сабуро без антибиотика тонкой линией. Посев инкубируется при 37°C 24-72 часа. Если культура принадлежит к роду *Candida*, то она образует мицелий в толще среды в виде тонких белесоватых нитей.

На среде Блаурокка изучается характер роста, при этом обращается внимание на плотные образования в виде тяжей, чечевичек, комочков ваты в столбике среды, с дальнейшей их микроскопией и окраской по Граму. Морфологически бифидобактерии грамположительные палочки с тенденцией к образованию скоплений в виде иероглифов, размеры клеток от 4 до 10 мкм, с утолщенными в виде «булавы» или раздвоенными концами. Количество бифидобактерий соответствует степени разведения фекалий, в котором они обнаружены. Например, если они обнаружены в разведении  $10^{-9}$ , то обсемененность составляет  $10^9$  КОЕ на 1 г фекалий. В результате указывается наибольшее их количество[34-35].

На среде Вильсон-Блер клостридии перфрингенс дают почернение среды за счет образования сернистого железа. Подтверждение культуры на принадлежность к роду *Clostridium* осуществляется по результатам микроскопии, каталазной активности и отсутствию роста в аэробных условиях на этой же среде. Клостридии морфологически – грамположительные палочки размером от 0,9 до 9 мкм, расположенные одиночно, попарно, в виде цепочек или скоплений параллельных клеток, спорообразование проявляется слабо. Каталазу не образуют. Количество клостридий в 1 г фекалий соответствует разведению, в котором они обнаружены[35-37].

На среде ЖСТ энтерококки дают рост плоских крупных колоний с ровными краями, белые или бледно окрашенные с незначительным кремовым или розовым оттенком, а также малиновые. Последние образованы *E.faecalis*. Если выросли другие по морфологии колонии, то их принадлежность к роду *Enterococcus* можно подтвердить по отсутствию каталазной активности и характерной морфологии клеток при микроскопии мазков, окрашенных по Граму.

Исследуемый материал поступал в микробиологическую лабораторию в стерильных одноразовых флаконах в течение 2-х часов с момента взятия материала. Исследование микробиоценоза кишечника проводилось в соответствии с рекомендациями, предложенными Котовой А.Л. с соавт. [5].

Количественную оценку содержания микроорганизмов проводили путем посева 10-кратных разведений исследуемого материала от  $10^{-1}$  до  $10^{-11}$  на чашки (пробирки) с питательными средами и последующего подсчета выросших колоний. Определение родовой и видовой принадлежности выделенных чистых культур проводилось в соответствии с приказами и методическими рекомендациями и в соответствии с классификацией, приведенной в 9-м издании определителя бактерий Берги. Идентификация выделенных чистых культур микроорганизмов проводилась на микробиологических анализаторах «MiniAPI» и «Vitek 2 – Compact» [31]

Полученные данные обработаны с помощью общепринятых методов статистического анализа с применением компьютерных программ.

#### **2.2.4 Методы статистической обработки**

Статистическая обработка данных по исследовательской работе проводилась на персональном компьютере с использованием статистической программы «Statistica 6.0» и «Microsoft Excel 2013».

Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики. Степень достоверности результатов оценивали по вероятности различий (P) на основании числа наблюдений сравниваемых рядов ( $n_1$   $n_2$ ) по критерию Стьюдента, где

$$t = \frac{M_1 - M_2}{\sqrt{m_1^2 + m_2^2}}$$

Различия в изучаемых совокупностях имеются при  $P < 0,05$

При альтернативном варьировании изучаемого признака ошибку средней величины определяли по формуле:

$$m = \pm \sqrt{p(100-p)/n},$$

где p – процент наличия признака.

При  $P > 0,05$  ( $t < 2$ ) разница между средними считалась незначительной, случайной, а при  $P < 0,05$  ( $t > 2$ ) – достоверной, с вероятностью 0,95.

Были подсчитаны среднее значение, стандарт, медиана, мода, дисперсия, произведено сравнение с помощью критерия Стьюдента.

## ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 3.1 Показатели микробиологических исследований микрофлоры фекалий обследованных до и после применения пробиотика Бифиформ

Показатели микробиологических исследований микрофлоры фекалий обследованных до и после применения пробиотика Бифиформ

Дисбактериоз диагностировался по следующим микробиологическим критериям (изменениям количества микрофлоры в бактериальных картах фекалий):

- снижение количества бифидобактерий менее  $10^8$  КОЕ /г фекалий; снижение лактобацилл менее  $10^6$  КОЕ /г;
- появление эшерихий с изменёнными свойствами (лактозоотрицательных форм кишечной палочки или кишечной палочки с изменёнными ферментативными свойствами) более 10% от общего количества;
- обнаружение энтерококков в количестве более  $10^7$  КОЕ/г;
- появление гемолитической микрофлоры;
- наличие облигатно-патогенных бактерий (сальмонелл, шигелл, патогенных сероваров кишечной палочки), являющихся экзогенным этиологическим фактором ОКИ;
- обнаружение условно-патогенных энтеробактерий (представителей родов *Enterobacter*, *Proteus*, *Klebsiella*, *Citrobacter* и др.), а также бактерий родов *Pseudomonas*, *Acinetobacter* и др. Этиологически значимой принималась концентрация данных бактерий  $10^5$  и выше КОЕ в 1 грамме.
- появление грибов рода *Candida*  $10^5$  и выше КОЕ в 1 грамме;
- наличие золотистых стафилококков;
- обнаружение *Clostridium* более  $10^5$  КОЕ/г.

В таблице 5 представлены результаты микробиологического исследования фекалий обследованных на дисбактериоз у 1 группы больных с *Helicobacter pylori*, ассоциированным хроническим гастритом, до и после эрадикации. Во время эрадикационной терапии применялась коррекция кишечной микрофлоры пробиотиком Бифиформ (группа 1).

Таблица 5 – Результаты микробиологического исследования фекалий на дисбактериоз до и после эрадикации (группа 1, n=21).

№	Показатели	Норма	до		после		t	p
			абс	%M±m	абс	%M±m		
1	Патогенные представители семейства <i>Enterobacteriaceae</i>	-	-		-			
2	Кишечная палочка с норм. фермен. активностью	$10^7-10^8$	5	23,8±9,2	12	57,1±10,8	2.36 1	<0,05



Продолжение таблицы 5

№	Показатели	Норма	до	после	t	p	№	Показатели
			абс	%M±m	абс	%M±m		
3	Кишечная палочка со сниженной ферментной активностью	$10^6-10^7$	0		0			
4	Лактозонегативная кишечная палочка	$\leq 10^5$	0		0			
5	Гемолитическая кишечная палочка	$< 10^4$	0		0			
6	Другие условно-патогенные энтеробактерии	$\leq 10^5$	5	23,8±9,2	1	4,7±4,6	1,872	>0,05
7	Бифидобактерии	$10^8-10^9$	19	90,4±6,4	20	95,2±4,6	0,615	>0,05
8	Лактобактерии	$10^7-10^8$	14	66,6±10,2	18	85,7±7,6	1,503	>0,05
9	Микробы рода Proteus	$\leq 10^4$	0		0			
10	Дрожжеподобные грибы рода Candida	$< 10^5$	6	28,5±9,8	1	4,7±4,6	2,203	<0,05
11	Стафилококки (S.epidermidis, S.saprophyticus)	$\leq 10^4$	0		0			
12	Staphylococcus aureus	$\leq 10^3$	3	14,2±7,6	0		-	
13	Клостридии	$< 10^5$	1	4,7±4,6	0		-	
14	Энтерококки	$10^5-10^6$	1	4,7±4,6	0		-	
15	НГОБ	$\leq 10^3$	0		0		-	

Результаты, приведенные в таблице 5, показывают, что микробиоценоз фекалий данной группы пациентов был представлен как облигатной, так и факультативной микрофлорой.

Патогенные представители семейства кишечных бактерий не были обнаружены в фекалиях пациентов данной группы.

К облигатным представителям нормофлоры относятся бифидобактерии, лактобактерии, вся сумма кишечных палочек и энтерококков.

По частоте встречаемости и количественному составу представители облигатной микрофлоры кишечника больных до и после терапии с пробиотиком распределились следующим образом; Бифидобактерии в количестве  $10^8$  и более КОЕ/г обнаруживались у 90,4% больных до эрадикационной терапии и у 95,2% ( $P>0,05$ ) после эрадикации совместно с пробиотиком, *E.coli* с нормальной ферментативной активностью была выделена у 23,8% обследуемых в количестве  $10^7$  и более КОЕ/г до эрадикационной терапии и 4,7 % после эрадикации ( $P>0,05$ ) Лактобациллы – 66,6% в количестве  $10^6$  КОЕ/г и более 85,7% после эрадикации ( $P>0,05$ ).

Факультативная микрофлора включала условно патогенные энтеробактерии, дрожжеподобные грибы рода *Candida*.

Условно-патогенные энтеробактерии выделены у 23,8% пациентов до эрадикации в количестве  $10^5$  КОЕ/г, и отмечается снижение до 4,7 % после эрадикации ( $P>0,05$ ).

Дрожжеподобные грибы рода *Candida* обнаружены в 28,5% исследованных образцах пациентов до эрадикации в количестве  $10^5$  и выше КОЕ/г и у 4,7% после применения терапии ( $P<0,05$ ).

Также до начала эрадикационной терапии у 3 пациентов был выделен *Staphylococcus aureus*. После проведения эрадикационной терапии в комплексе с пробиотиком патогенный стафилококк у данных пациентов в посевах фекалий отсутствовал.

**Клинический раздел.** При оценке клинических симптомов учитывалось наличие болей в эпигастральной области, изжоги, диспепсических расстройств (тошнота, метеоризм, нарушения стула) и болезненность при пальпации в эпигастральной области. Оценка клинических симптомов осуществлялась в баллах в зависимости от степени выраженности того или иного симптома (от 0 до 3 баллов).

Все пациенты были клинически обследованы (производился сбор жалоб, объективный осмотр) до лечения, на 7-8 день эрадикационной терапии, и через 10 дней после эрадикационной терапии, данные по исследованию указаны в таблице 6.

Таблица 6 - Клинические показатели до, во время после лечения в группе со стандартной эрадикационной терапией и приемом пробиотика «Бифиформ».  $P=0,0007$ ,  $P< 0,05$ .

Показатели	До лечения, n=21	Во время лечения на 7-8 день эрадикационной терапии n=21	После эрадикации на 10 день n=21
Тошнота	61%	28%	0
Рвота	4,7%	0	0
Изжога	42,8%	19%	4,7%
Боли в	95,2%	80%	14%

эпигастральной области			
Продолжение таблицы 6			
Тяжесть после приема пищи	76,1%	61%	4,7%
Вздутие живота	47,6%	66%	9,5%
Металлический привкус во рту	0	66%	0
Диарея	4,7%	14%	0

Изменение клинических показателей представлено на рисунке 7, пациенты обращались с различными жалобами, характеризующие нарушение функции желудочно-кишечного тракта. У 61% отмечалось наличие тошноты, 4,7% рвоты после лечения тошнота и рвота купирована ( $P < 0,05$ ).

Изжога 42,8%, боли в эпигастральной области 95%, тяжесть после приема пищи 76%, вздутие живота 47% в динамике жалобы регистировали ( $P < 0,05$ ). Одним из главных синдромов - диарея, до лечения отмечалось 4,7%, после лечения у пациентов диареи не наблюдалось.

По данным клинических показателей отмечается статистическая разница клинических данных до и после эрадикационной терапии, характеризующееся как положительной динамикой в клинических показателей, так и улучшением качественного и количественного состава кишечной микробиоты.

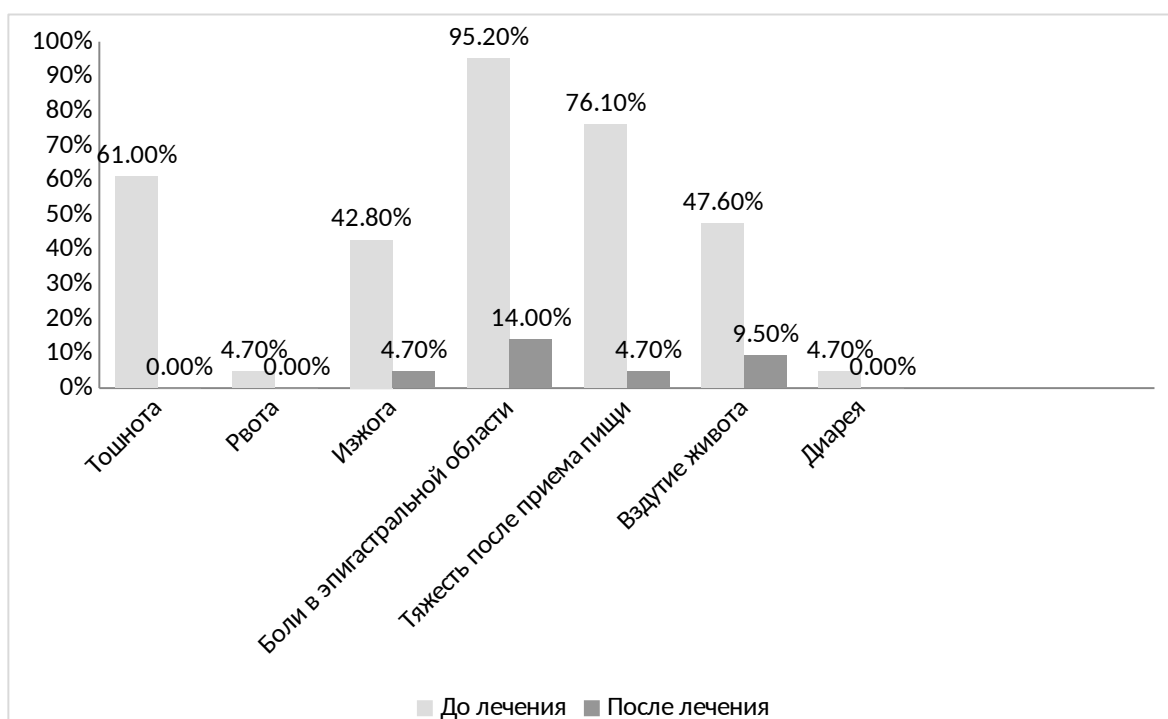


Рисунок 7 - Клинические показатели до и после эрадикационной терапии в группе с комплексным использованием эрадикационной терапии и пробиотика «Бифиформ»

Прием пробиотика «Бифиформ» снижает побочное действие антибактериальной терапии и улучшает микрофлору кишечника, повышая количество облигатной микрофлоры и уменьшения условно-патогенной микрофлоры

### 3.1.1. Показатели микробиологических исследований микрофлоры фекалий обследованных до и после применения биологической активной добавки БАД «Ультробиотик»

Показатели микробиологических исследований микрофлоры фекалий обследованных до и после применения биологической активной добавки БАД «Ультробиотик» представлены в таблице 7.

Таблица 7 – Результаты микробиологического исследования фекалий на дисбактериоз до и после эрадикации (группа 2, n=20)

№	Показатели	Норма	до		после		t	p
			абс	%M±m	абс	% M±m		
1	Патогенные представители семейства Enterobacteriaceae	-	-		-			
2	Кишечная палочка с нормальной ферментативной активностью	10 <sup>7</sup> - 10 <sup>8</sup>	10	50±11,1	14	66,6± 1	4,504	<0, 001
3	Кишечная палочка со сниженной ферментативной активностью	10 <sup>6</sup> - 10 <sup>7</sup>	2	10±6,7	3	15±7, 9	0,485	>0, 05
4	Лактозонегативная кишечная палочка	≤10 <sup>5</sup>	0		0			
5	Гемолитическая кишечная палочка	<10 <sup>4</sup>	0		0			
6	Другие условно-патогенные энтеробактерии	≤10 <sup>5</sup>	2	10±6,7	0		-	
7	Бифидобактерии	10 <sup>8</sup> - 10 <sup>9</sup>	14	70±4,7	16	87±6, 5		>0, 05
8	Лактобактерии	10 <sup>7</sup> - 10 <sup>8</sup>	13	65±7,3	15	72±10 ,2		>0, 05
9	Микробы рода Proteus	≤10 <sup>4</sup>	0		1	5±4,8	-	
10	Дрожжеподобные грибы рода Candida	<10 <sup>5</sup>	15	75±9,6	6	30±10 ,2	3,214	<0, 01
11	Стафилококки (S.epidermidis,S.saprophyticus)	≤10 <sup>4</sup>	0		0			

12	Staphylococcus aureus	$\leq 10^3$	3	15±7,9			-	
----	-----------------------	-------------	---	--------	--	--	---	--

Продолжение таблицы 7

13	Клостридии	$< 10^5$	0		2	10±6, 7	-	
14	Энтерококки	$10^5$ - $10^6$	0		0			
15	НГОб	$\leq 10^3$	0		0			

По данным результатов исследования показатели микробиологического исследования распределились следующим образом;

-отмечается снижение количества бифидобактерий менее  $10^8$  КОЕ /г фекалий;

- снижение лактобацилл менее  $10^6$  КОЕ /г;

-обнаружение условно-патогенных энтеробактерий (представителей родов Enterobacter, и др). Этиологически значимой принималась концентрация данных бактерий  $10^5$  и выше КОЕ в 1 грамме.

- появление грибов рода Candida  $10^5$  и выше КОЕ в 1 грамме;

- наличие золотистых стафилококков;

Необходимо отметить следующее: бифидобактерии в количестве  $10^8$  и более КОЕ/г обнаруживались у 70% больных до эрадикационной терапии и у 87% после эрадикации совместно с пробиотиком ( $P>0,005$ ). E.coli с нормальной ферментативной активностью была выделена у 50 % обследуемых в количестве  $10^5$  и более КОЕ/г до эрадикационной терапии и 66,6% после эрадикации ( $P<0,001$ )

Условно-патогенные энтеробактерии выделены у 2 пациентов до эрадикации в количестве  $10^5$  КОЕ/г обнаружено у 10%, после отсутствовало.

Дрожжеподобные грибы рода Candida обнаружены в фекалиях исследованных образцах пациентов до эрадикации в количестве  $10^5$  и выше КОЕ/г у 75% и после эрадикации отмечается значительное снижение до 30% ( $P<0,01$ ). Количество пациентов с выделением дрожжеподобные грибы рода Candida в кале после терапии с пробиотиком уменьшилось до шести.

До начала эрадикационной терапии у 3 пациентов в кале был выделен Staphylococcus aureus. После проведения терапии в комплексе с пробиотиком патогенный стафилококк у данных пациентов в посевах фекалий отсутствовал.

После эрадикационной терапии совместно с пробиотиком отмечается появление микроба рода Proteus у одного пациента в количестве  $10^4$  и выше КОЕ/г. Наличие Клостридии у 2 пациентов после эрадикации, выделены выше  $10^5$  и составляет 10%.

Микрофлора кишечника больных после применения пробиотика, характеризуется повышением количества лактобактерий, бифидобактерий,

кишечной палочки с нормальной ферментативной активностью. В составе кишечного микробиоценоза уменьшаются и качественно, и количественно условно патогенные энтеробактерии, дрожжеподобные грибы рода *Candida*, *Staphylococcus aureus*.

В таблице 8 представлены клинические показатели до, во время после лечения в группе со стандартной эрадикационной терапией

Таблица 8 - Клинические показатели до, во время после лечения в группе со стандартной эрадикационной терапией БАД «Ультробиотик».  $P=0,01$ ,  $P<0,05$ .

Показатели	До лечения, n=20	Во время лечения на 7-8 день эрадикационной терапии n=20	После эрадикации на 10 день n=20
Тошнота	60%	55%	5%
Рвота	3%	0	0
Изжога	20%	10%	0%
Боли в эпигастральной области	95%	90%	20%
Тяжесть после приема пищи	100%	95%	20%
Вздутие живота	95%	85%	20%
Металлический привкус во рту	0	90%	0%
Диарея	4,7%	20%	10%

Клинические показатели представлены на рисунке 9, пациенты обращались с жалобами. У 60% отмечалось наличие тошноты, после лечения наблюдается у 5%, у 3%- рвота, после лечения рвота купирована.

До эрадикационной терапии наблюдалось; изжога - 20 %, боли в эпигастральной области - 95%, тяжесть после приема пищи - 100%, вздутие живота - 95%. В динамике после эрадикационной терапии в комплексе с «Ультробиотиком» отмечается регрессирование вышеописанных жалоб ( $P<0,05$ ). Одним из главных синдромов, показатель дисбиоза - диарея до лечения отмечалась у 4,7%, после лечения у пациентов диареи не наблюдалось.

По данным клинических показателей отмечается статистическая разница клинических данных до и после эрадикационной терапии, которая характеризуется как положительной динамикой в клинических показателях, так и улучшением качественного и количественного состава кишечной микробиоты.

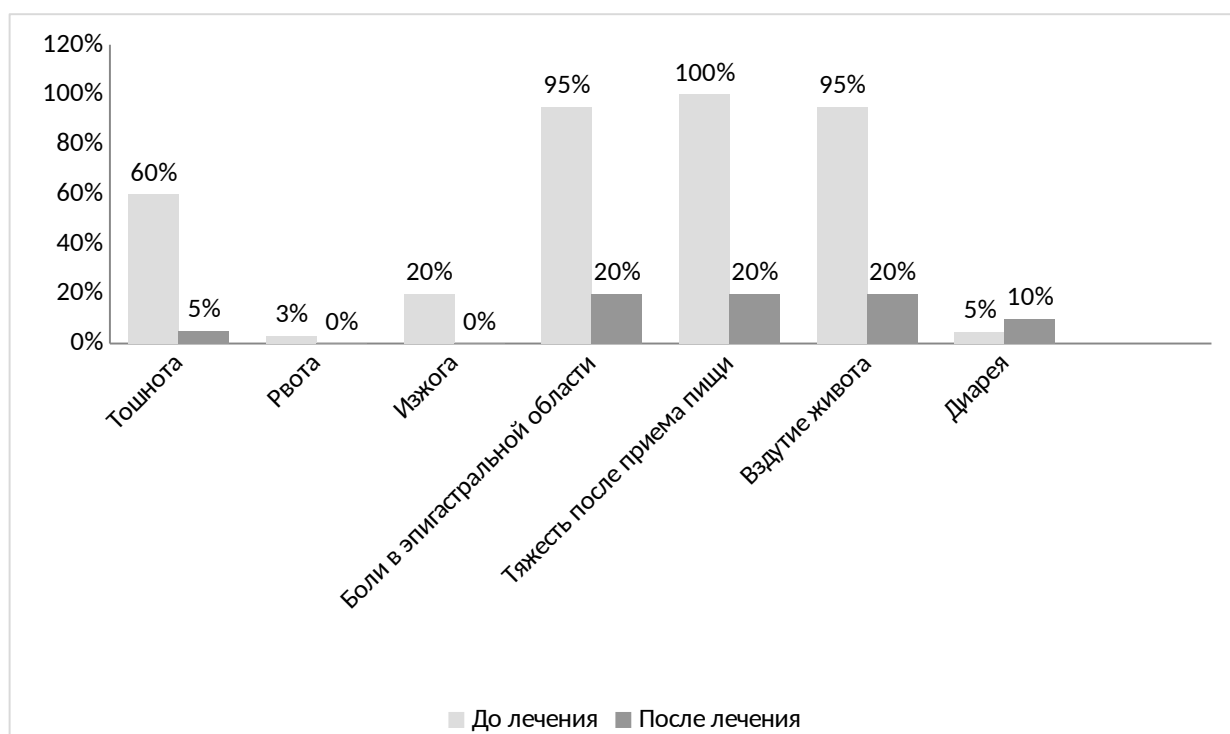


Рисунок 9 - Клинические показатели до и после эрадикационной терапии в группе с комплексным использованием эрадикационной терапии и пробиотика «Ультробиотик»

Прием биологической активной добавки «Ультробиотик» снижает побочное действие антибактериальной терапии и улучшает микрофлору кишечника повышая количество нормофлоры и уменьшения условно-патогенной микрофлоры.

### 3.1.2. Показатели микробиологических исследований микрофлоры фекалий обследованных до и после эрадикационной терапии без использования пробиотиков (n=20)

В таблице 9 представлены результаты микробиологического исследования фекалий обследованных на дисбактериоз у (контрольной) группы больных с *Helicobacter pylori*, ассоциированным хроническим гастритом, до и после эрадикационной терапии без применения пробиотика.

Таблица 9 – Результаты микробиологического исследования фекалий обследованных (n=20,) на дисбактериоз до и после (Контрольная группа)

№	Показатели	Норма	до		после		t	p
			абс	%M±m	абс	%M±m		
1	Патогенные представители с-ва enterobacteriaceae	-	-		-			

Продолжение таблицы 9

2	Кишечная палочка с норм. фермен. активностью	$10^7$ - $10^8$	14	7 $0 \pm 10,2$	13	$65 \pm 10,6$	1,020	$>0,0$ 5
3	Кишечная палочка со сниженной фермен. активностью	$10^6$ - $10^7$	0		0			
4	Лактозонегативная кишечная палочка	$\leq 10^5$	0		0			
5	Гемолитическая кишечная палочка	$< 10^4$	0		0			
6	Другие условно-патогенные энтеробактерии	$\leq 10^5$	4	$20 \pm 8,9$	2	$10 \pm 6,7$	0,900	$>0,0$ 5
7	Бифидобактерии	$10^8$ - $10^9$	19	$90 \pm 9,6$	17	$85 \pm 7,9$	1,898	$>0,0$ 5
8	Лактобактерии	$10^7$ - $10^8$	18	$90 \pm 6,7$	15	$75 \pm 9,6$	1,282	$>0,0$ 5
9	Микробы рода <i>Proteus</i>	$\leq 10^4$	1	$5 \pm 4,8$	2	$10 \pm 6,7$	0,609	$>0,0$ 5
10	Дрожжеподобные грибы рода <i>Candida</i>	$< 10^5$	4	$20 \pm 8,9$	11	$55 \pm 11,1$	2,464	$<0,0$ 5
11	Стафилококки ( <i>S. epidermidis</i> , <i>S. saprophyticus</i> )	$\leq 10^4$	0		0			
12	<i>Staphylococcus aureus</i>	$\leq 10^3$	1	$5 \pm 4,8$	2	$10 \pm 6,7$	0,609	$>0,0$ 5
13	Клостридии	$< 10^5$	1	$5 \pm 4,8$	2	$10 \pm 6,7$	0,609	$>0,0$ 5
14	Энтерококки	$10^5$ - $10^6$	0		0			
15	НГОб	$\leq 10^3$	1	$5 \pm 4,8$	0		-	

По данным результатов исследования до эрадикационной терапии отмечается снижение количества бифидобактерий менее  $10^8$  КОЕ /г фекалий, снижение лактобацилл менее  $10^6$  КОЕ, обнаружение условно-патогенных энтеробактерий (представителей родов *Enterobacter*, и др). Наличие грибов рода *Candida*  $< 10^5$  и выше КОЕ в 1 грамме, наличие золотистого стафилококка.

Необходимо отметить следующее: бифидобактерии в количестве  $10^8$  и более КОЕ/г обнаруживались у 90% больных до эрадикационной терапии и у 85% после эрадикации совместно с пробиотиком ( $P > 0,005$ ). *E.coli* с нормальной ферментативной активностью была выделена у 70 % обследуемых



в количестве  $10^5$  и более КОЕ/г до эрадикационной терапии и 65 % после эрадикации ( $P > 0,001$ ).

Условно-патогенные энтеробактерии выделены у 2 пациентов до эрадикации в количестве  $10^5$  КОЕ/г.

Дрожжеподобные грибы рода *Candida* обнаружены в фекалиях исследованных образцах пациентов до эрадикации в количестве  $10^5$  и выше КОЕ/г, у 20% и после эрадикации отмечается значительное увеличение до 55% ( $P < 0,05$ ). Количество пациентов с выделением дрожжеподобных грибов рода *Candida* в кале после антибактериальной терапии без пробиотика увеличилось у семи пациентов.

До начала эрадикационной терапии у 1 пациента в кале был выделен *Staphylococcus aureus* ( $P > 0,05$ ). После проведения терапии патогенный стафилококк обнаружен у двоих пациентов.

До эрадикационной терапии отмечается появление микроба рода *Proteus* у одного пациента в количестве  $10^4$  и выше КОЕ/г, после эрадикации *Proteus* обнаружен у двух пациентов. Так же выявлено наличие Клостридии у одного пациента до эрадикации, после эрадикации у двоих пациентов - 10% ( $P > 0,05$ ).

Микрофлора кишечника больных после эрадикационной терапии без применения пробиотика характеризуется понижением количества лактобактерий, бифидобактерий, кишечной палочки с нормальной ферментативной активностью. В составе кишечного микробиоценоза повышаются качественно и количественно условно патогенные энтеробактерии, дрожжеподобные грибы рода *Candida*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus*, *Clostridium*.

Таблица 10 - Клинические показатели до, во время после лечения в контрольной группе без применения пробиотиков  $P = 0,14$ ,  $P > 0,05$

Показатели	До лечения, n=20	Во время лечения на 7-8 день эрадикационной терапии n=20	После эрадикации на 10 день n=20
Тошнота	40%	60%	5%
Рвота	5%	9%	5%
Изжога	5%	30%	0%
Боли в эпигастральной области	80%	97%	40%
Тяжесть после приема пищи	95%	72%	55%
Вздутие живота	45%	90%	75%
Металлический привкус во рту	0	90%	0%
Диарея	5%	65%	40%

Клинические показатели в группе без применения пробиотика указаны в рисунке 10.

До эрадикационной терапии наблюдались; изжога - 5 %, боли в эпигастральной области - 80%, тяжесть после приема пищи - 95%, вздутие живота - 45%. В динамике после стандартной эрадикационной терапии положительной динамики не отмечается, наблюдается нарастание вздутия живота до 75% и диарей 40%. ( $P > 0,05$ ).

Изменение по данным клинических показателей до и после лечения с приемом стандартной эрадикационной терапии представлены на рисунке 10.

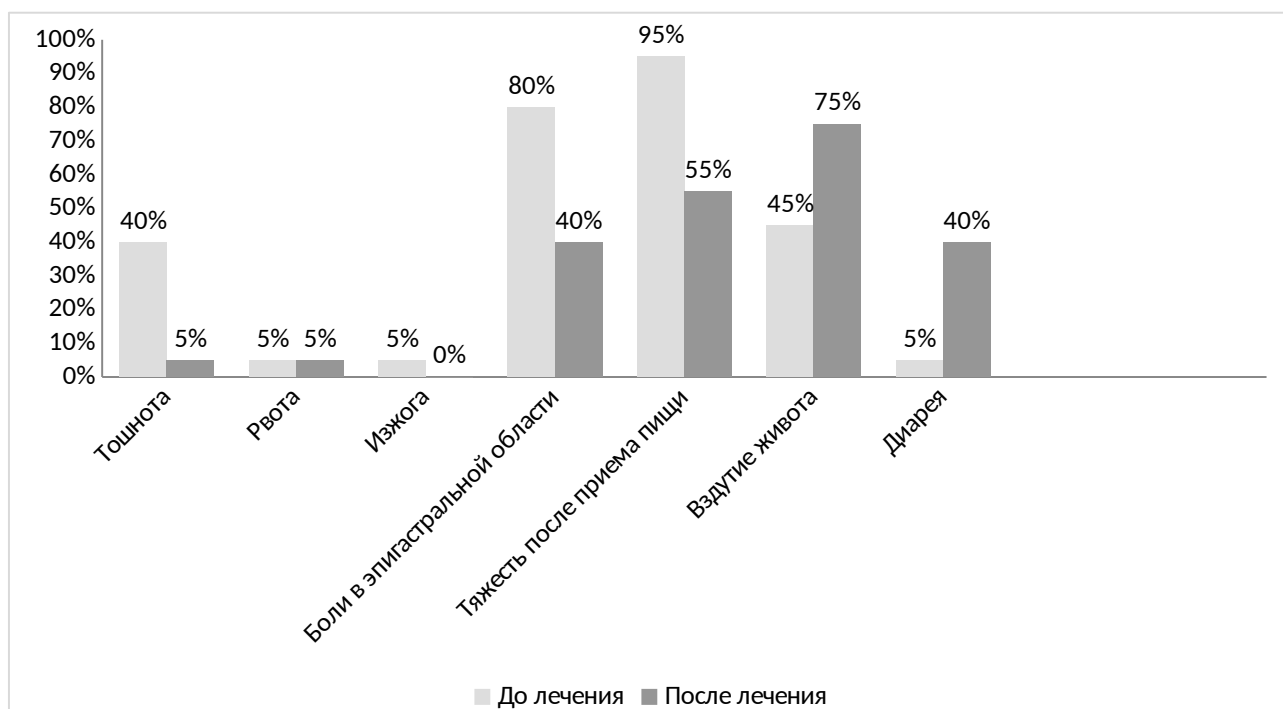


Рисунок 10 - Клинические показатели пациентов до и после эрадикационной терапии без пробиотиков

Сравнивая полученные результаты в трех группах можно отметить, что в первой и второй группе после проведенной терапии улучшились показатели состояния кишечной микрофлоры, характеризующиеся увеличением облигатной микрофлоры и уменьшением количества условно-патогенных микроорганизмов. У пациентов первой группы с применением пробиотика «Бифиформ» степень дисбиотических нарушений изменилась с положительной динамикой ростом нормофлоры и полной эрадикацией факультативной микрофлоры. Во второй группе у лиц принимавших эрадикационную терапию с БАД «Ультробиотик» отмечается рост нормофлоры и уменьшение факультативной микрофлоры. По данным контрольной группы, у пациентов отмечалось снижение уровня представителей нормальной кишечной микрофлоры после эрадикации, чем в группе с применением пробиотиков и ростом условно патогенных микроорганизмов.

По данным клинических показателей отмечается что, в первой и второй группе с применением эрадикационной терапии в сочетании с пробиотиком частота побочных действий значительно ниже в отличии в группах без приема пробиотика. Данные исследования приведены ниже (рисунок 11).

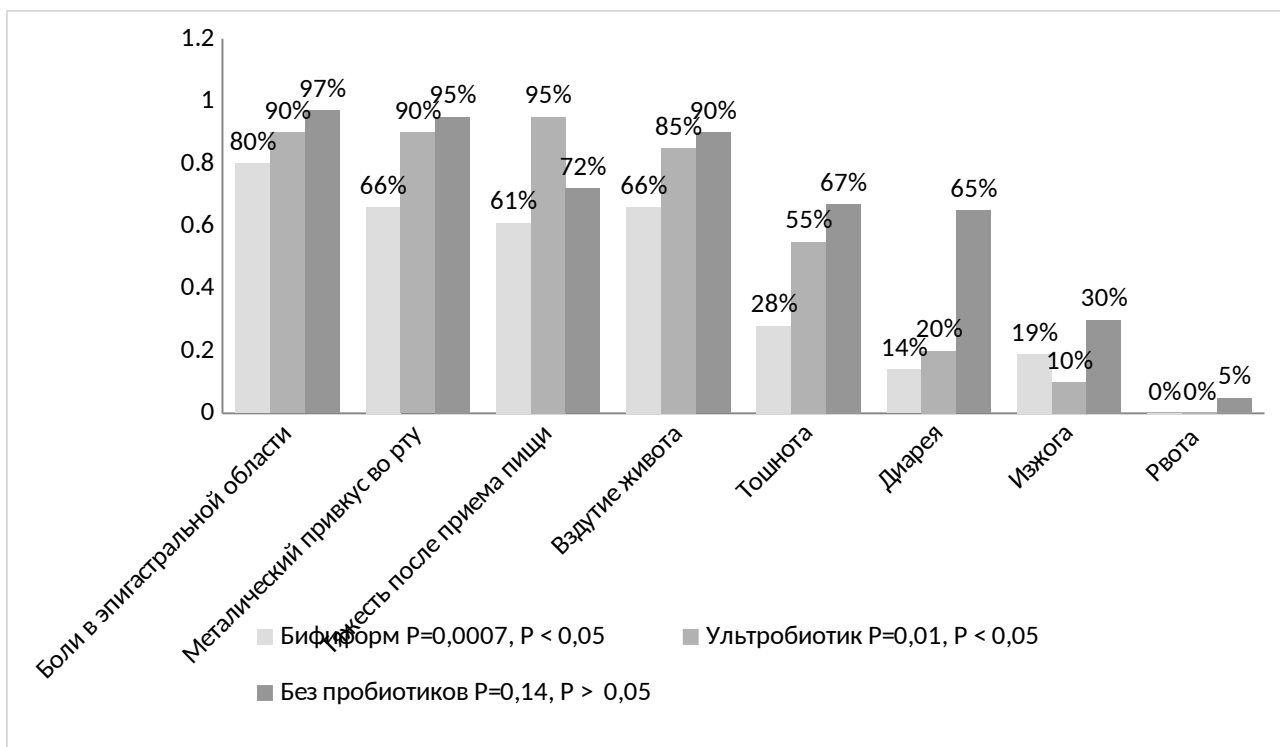


Рисунок 11 - Показатели клинического исследования во время эрадикационной терапии в разных группах

Под наблюдением находилось 127 пациентов с хроническим НР-ассоциированным гастритом. У всех больных диагноз был верифицирован в ходе эндоскопического исследования. Наличие *H.pylori* было подтверждено у 61 пациента с помощью иммунохроматографической тест системы PreventID для определения антигенов *H. pylori* в кале (экспресс тест).

При контрольном исследовании, спустя 4 недели после проведенной терапии, эффективность эрадикацией *H.pylori* наблюдалась:

- в группе с приемом стандартной антихеликобактерной терапией (контрольная группа) составила 85%. У 17 из 20 пациентов достигнута эрадикация *H.pylori*;

- в группе с комбинированной терапией (с приемом пробиотика «Бифиформ»)- 100% эрадикация

- в группе с комбинацией эрадикационной терапии с биологической активной добавкой «Ультробиотик» - 95%.

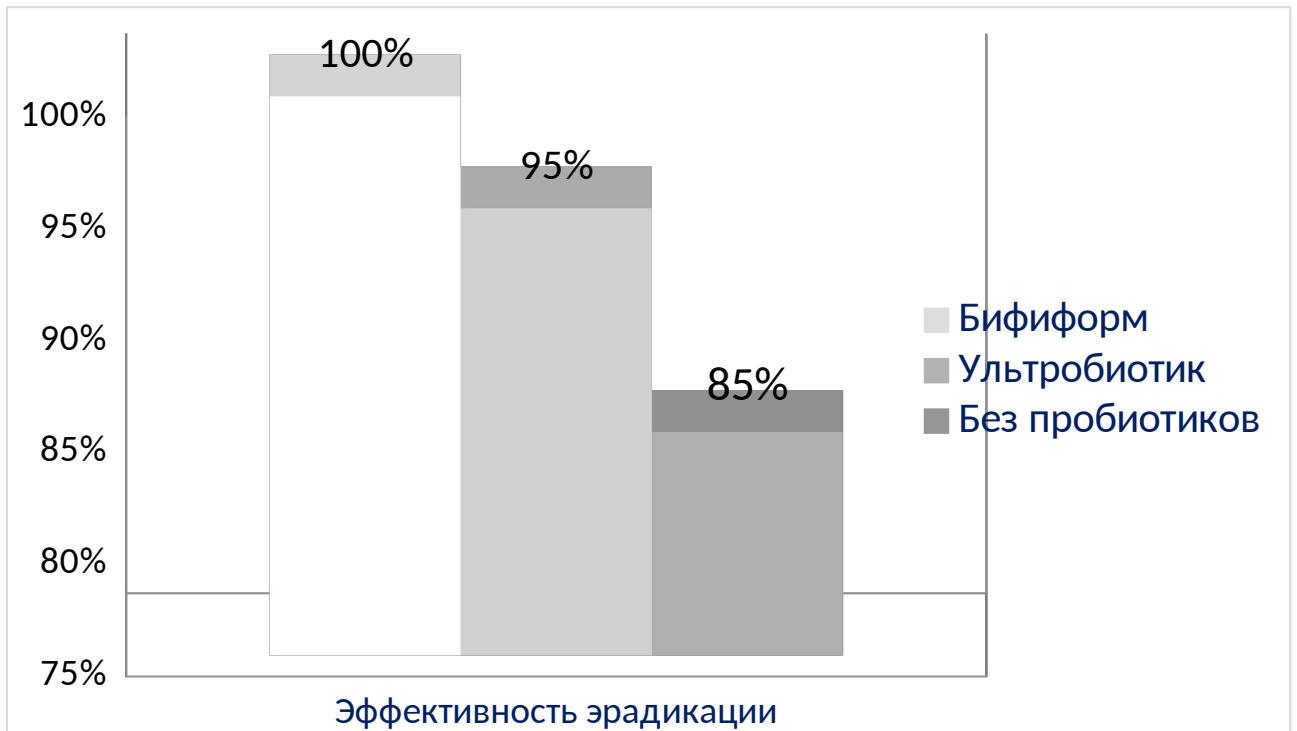


Рисунок 12 - Эффективность эрадикации в разных группах

По данным из рисунка 12 следует, что после проведенной терапии *H.pylori*, эффективность эрадикации была выше в группах с применением пробиотиков в комплексе с эрадикацией. Можно предположить, что этот факт обусловлен действием пробиотиков.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Данная работа планировалась с целью изучить нарушения кишечной микробиоты у больных с *Helicobacter pylori*-ассоциированных хроническим гастритом до и после эрадикации, провести сравнительный анализ эффективности пробиотических средств в комплексной эрадикационной терапии.

В настоящее время особое внимание уделяется изучению эндоэкологии человека и экосистемы желудочно-кишечного тракта как одной из ее составляющих. Микрофлора кишечного тракта представляет собой сложную высокочувствительную индикаторную систему, реагирующую качественными и количественными сдвигами на изменения состояния различных органов и систем и человеческого организма в целом. Так как желудочно-кишечный тракт представляет собой единую систему, то не следует рассматривать заболевания желудка изолированно от состояния кишечника. Хронические заболевания ЖКТ, в частности – хронический гастрит, являются одним из факторов, способствующих нарушению равновесия между представителями кишечной микрофлоры и развитию дисбиоза.

В данном исследовании проводилась оценка состояния кишечного микробиоценоза у пациентов с НР-ассоциированным гастритом, а также состава кишечной микрофлоры после применения различных схем терапии.

По данным обследования у 80% пациентов с НР-ассоциированным гастритом имел место дисбиоз различной степени тяжести. После проведенного лечения у пациентов, получавших комбинированную терапию, включавшую стандартную эрадикационную тройную схему в сочетании с пробиотиком.

После проведенного лечения у пациентов, получавших комбинированную терапию, включавшую стандартную эрадикационную тройную схему в сочетании с пробиотическим препаратом, состояние кишечного микробиоценоза достоверно улучшилось. У пациентов, получавших только стандартную эрадикационную терапию, состояние кишечной микрофлоры значимо не изменилось, кроме того, у ряда больных отмечалось уменьшение содержания представителей нормальной микрофлоры, и увеличением патогенной микрофлоры. Полученные данные свидетельствуют о том, что использование пробиотических препаратов благотворно влияет на состояние кишечного микробиоценоза.

При сравнении групп со стандартной эрадикационной терапией комбинированной можно отметить, что добавление пробиотика к терапии улучшило успешность эрадикации.

По результатам исследования можно судит о том, что применение пробиотика увеличивает частоту эрадикации. Прием эрадикационной терапии совместно с пробиотическим препаратом достоверно улучшилось состояние кишечного микробиоценоза.

Данная работа свидетельствует о перспективности, наряду с совершенствованием схем эрадикации *Helicobacter pylori*, разработки

терапевтических подходов, направленных на изменение реактивности макроорганизма.

## ВЫВОДЫ

1. У пациентов с хроническим гастритом ассоциированным с *Helicobacter pylori* до эрадикации в микробиоценозе кишечника наблюдается снижение облигатной микрофлоры и увеличение количества факультативной микрофлоры. Кишечная палочка с нормальной ферментативной активностью выделена только у 24 % обследуемых в количестве  $10^7$  и более КОЕ/г. У 17 % обследуемых лиц в фекалиях обнаруживался *Staphylococcus aureus*. Условно-патогенных энтеробактерии выше нормы выделены у 24 %. Процент обнаруженных грибов рода *Candida*, превышающих нормативные показатели более  $10^5$  КОЕ/г., составил 10%.

2. Микрофлора кишечника больных после эрадикационной терапии в комплексе с пробиотиком, характеризуется значительным повышением количества лактобактерий, бифидобактерий, кишечной палочки с нормальной ферментативной активностью. В составе кишечного микробиоценоза уменьшаются и качественно, и количественно условно- патогенные энтеробактерии, дрожжеподобные грибы рода *Candida* и *Staphylococcus aureus*.

3. Применение пробиотиков совместно с эрадикационной терапией снизило частоту побочных действий таких как диарея, вздутие живота и повысило приверженность пациентов к лечению.

4. Эффективность эрадикации по результатам экспресс stool-теста определения антигенов *H. pylori* в кале после эрадикации составила: в группе с применением эрадикационной терапии совместно с пробиотиком «Бифиформ» составил 100%, в группе БАД «Ультробиотик» - эрадикационная терапия 95%, в группе без пробиотиков 85%. Использование пробиотиков повышает эффективность трехкомпонентной эрадикационной терапии.

## **ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

1. Полученные данные о дисбиотическом сдвиге микрофлоры кишечника при хроническом гастрите ассоциированным с *Helicobacter pylori* до эрадикации ориентируют врачей на мероприятие, которое непосредственно будет направлено для профилактики побочных эффектов эрадикационной терапии с использованием пробиотика.

2. Предложены способы коррекции микробиоценоза кишечника во время эрадикационной терапии, способствующие снижению частоты дисбиотических сдвигов и побочных действий.

3. Прием пробиотиков улучшает успешность эрадикации.



## СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. McFarland L.V., Huang Y., Wang L., Malfertheiner P. Systematic review and meta-analysis: Multi-strain probiotics as adjunct therapy for *Helicobacter pylori* eradication and prevention of adverse events. *United European Gastroenterology Journal*. 2016, Vol. 4(4) 546–561.
2. Papamichael K., Mantzaris GJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection: Colonization, virulence factors of the bacterium and immune and non-immune host response. *Nosokom Chron* 2012; 7: 32–37.
3. Malfertheiner P, Link A and Selgrad M. *Helicobacter pylori*: Perspectives and time trends. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014; 11: 628–638.
4. Gisbert JP and Calvet X. Review article: The effectiveness of standard triple therapy for *Helicobacter pylori* has not changed over the last decade, but it is not good enough. *Aliment Pharmacol Ther* 2011; 34: 1255–1268.
5. Ierardi E, Giorgio F, Losurdo G, et al. How antibiotic resistances could change *H. pylori* treatment: A matter of geography? *World J Gastroenterol* 2013; 19: 8168–8180.
6. Yang JC, Lu CW and Lin CJ. Treatment of *Helicobacter pylori* infection: Current status and future concepts. *World J Gastroenterol* 2014; 20: 5283–5293.
7. Delchier JC, Malfertheiner P and Thieroff-Ekerdt R. Use of a combination formulation of bismuth, metronidazole and tetracycline with omeprazole as a rescue therapy for eradication of *H. pylori*. *Aliment Pharmacol Ther* 2014; 40: 171–177.
8. Masoodi M, Talebi-Taher M, Tabatabaie K, et al. Clarithromycin vs. gemifloxacin in quadruple therapy regimens for empiric primary treatment of *H. pylori* infection: A randomized clinical trial. *Middle East J Dig Dis* 2015; 7: 88–93.
9. Yang YJ., Sheu BS., Metabolic Interaction of *Helicobacter pylori* Infection and Gut Microbiota. *Microorganisms* 2016, 4, 15.
10. Stearns, J.C.; Lynch, M.D.; Senadheera, D.B.; Tenenbaum, H.C.; Goldberg, M.B.; Cvitkovitch, D.G.; Croitoru, K.; Moreno-Hagelsieb, G.; Neufeld, J.D. Bacterial biogeography of the human digestive tract. *Sci. Rep.* 2011, 1, 170.
11. Yin, Y.N.; Wang, C.L.; Liu, X.W.; Cui, Y.; Xie, N.; Yu, Q.F.; Li, F.J.; Lu, F.G. Gastric and duodenum microflora analysis after long-term *Helicobacter pylori* infection in Mongolian Gerbils. *Helicobacter* 2011, 16, 389–397.
12. Д.Д. Сафина, С.Р. Абдулхаков, Р.А. Абдулхаков, Р.К. Исмаилова, А.В. Тяхт, А.С. Попенко. *H. pylori*, микробиота кишечника, антибиотикорезистентность: есть ли взаимосвязь? *Гены & клетки*. 2014. Том IX, № 3.
13. Bühling A., Radun D., Müller W.A. et al. Influence of anti-*Helicobacter* triple-therapy with metronidazole, omeprazole and clarithromycin on intestinal microflora. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 2001; 15(9): 1445–52.
14. Peter Malfertheiner, Francis Megraud, Colm A O’Morain, John Atherton, Anthony T R Axon, Franco Bazzoli, Gian Franco Gensini, Javier P Gisbert, David Y Graham, Theodore Rokkas, Emad M El-Omar, Ernst J Kuipers, European *Helicobacter* Study Group (Европейская группа по изучению *Helicobacter pylori*,

EHSG). Диагностика и лечение инфекции *Helicobacter pylori* – отчет согласительной конференции Маастрихт IV/Флоренция. Вестник практического врача (2012) Спецвыпуск 1.- С. 3-18.

15. Malfertheiner P., Megraud F., O`Morain C. et al. Management of *Helicobacter Pylori* infection – Maastricht IV / Florence Consensus Report Gut. 2012; 61: 646.

16. Ивашкин В.Т., Мегро Ф., Лапина Т.Л., *Helicobacter pylori*: революция в гастроэнтерологии. М., 1999.

17. Сиппонен П., Сеппала К. Гастрит-атрофический гастрит-кишечная метоплазия-рак желудка: /Российский журнал., гастроэнтерология., гепатолог., колопроктол.-1999:2:30-35.

18. Elswick G.D.Lim L.L. Byles J.E.et al. Association of *Helicobacter pylori* infection with gastric carcinoma: A meta-analysis/ Am.j.Gastroenterol.-1999:94:2373-2379

19. Szajewska H, Horvath A, Piwowarczyk A. Meta-analysis: the effects of *Saccharomyces boulardii* supplementation on *Helicobacter pylori* eradication rates and side effects during treatment. Aliment Pharmacol Ther 2010; 32: 1069–79.

20. Ткаченко Е.И., Авалуева Е.Б., Успенский Ю.П. и др Эрадикационная терапия, включающая пробиотики: консенсус эффективности и безопасности// Клин. Питание. 2005 г. -№1-С 14-20.

21. Дисбиоз кишечника. Руководство по диагностике и лечению / Под ред. Е.И. Ткаченко, А.Н.Суворов. –СПб.: Спец Лит 2007-238с.

22. Gotteland M., Brunser O, Cruchet S Systematic review: are probiotic useful in controlling gastric colonization by *Helicobacter pylori*?// Aliment. Parmacol. Ther . 2006.-Vol.23., №8-Р.1077-1086.

23. Козлова Д.И. Состояние кишечной микробиотициноза и течение *Helicobacter Pylori* ассоциированного гастрита в условиях эрадикационной и синбиотической терапии: автореферат . дис.. кан. Мед.наук.-СПб, 2004.-21 с.

24. Исаков В.А., Домарадский И.В. Хеликобактериоз. М.: Мед-практика, 2003.

25. Szajewska H, Horvath A, Piwowarczyk A. Meta-analysis: the effects of *Saccharomyces boulardii* supplementation on *Helicobacter pylori* eradication rates and side effects during treatment. Aliment Pharmacol Ther 2010; 32: 1069–79

26. Ю.П.Успенский1, Н.В.БарышниковаПробиотики в эрадикации инфекции *Helicobacter pylori*. CONSILIUM MEDICUM , 2014 //ТОМ 16 //№ 8 //www.con-med.ru cnh 28-29

27.Успенский Ю.П., Суворов А.Н., Барышникова Н.В. Инфекция *Helicobacter pylori* в клинической практике. СПб.: ИнформМед, 2011. 572 с.:ил., 16 с.

28. Graham D.Y., Fischbach L. *Helicobacter pylori* treatment in the era of increasing antibiotic resistance // Gut. 2010. Vol. 59. P. 1143–1153.

29 Szajewska H, Horvath A, Piwowarczyk A. Meta-analysis: the effects of *Saccharomyces boulardii* supplementation on *Helicobacter pylori* eradication rates

and side effects during treatment. // *Aliment Pharmacol Ther.* 2010. Vol. 32. P. 1069–1079.

30. Villoria A. Acid-related diseases: are higher doses of proton pump inhibitors more effective in the treatment of *Helicobacter pylori* infection? // *Gastroenterol Hepatol* 2008. Vol. 31. P. 546–547.

31. Л.Б. Лазебник, П.Л.Щербакова . Гастроэнтерология, болезни взрослых 2011: стр 122-123.

32. Бондаренко В.М., Мацулеевич Т.В., Дисбактериоз кишечника как клиничко-лабораторный синдром: современное состояние проблемы. –М., 2007.

33. Шендеров Б.А. Нормальная микрофлора кишечника и ее роль в поддержании здоровья человека/ российский журнал гастроэнтерология , гепатология, колопроктология-1998: 1: 61-65.

34. Циммерман Я.С. Дисбактериоз кишечника или « синдром избыточного бактериального роста»/ *Клин . мед.*-2005:4:14-22.

35. Takagi A., Kodat Y. Therapeutic effect of *Lactobacillus gasseri* and *plautol* on the triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication/ *Helicobacter*. 2006: 11(4):19-36. Kailasapathy K., Chin J . Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacteria spp*// *Immunol. Cell Biol.* 2000, 78(1): 80-88.

37. Collado M.C., Gonzales A., Gonzales R. et al Antimicrobial peptides are among the antagonistic metabolites produced by *Bifidobacterium* against *Helicobacter pylori*// *Int.J. Antimicrob. Agents.* 2005, 25(5):385-391.

38. Eckburg P.B., Bik E.M., Bernstein C.N., et al Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science.* 2005, 308:1635-1638.

39. Koll –Klais P., Mandar R., Leibur E. et al in chronic periodontitis and periodontal health: species composition and antimicrobial activity// *Oral Microbiol. Immunol.* 2005, 20(6):354-361.

40. Logan A.C., Venket R.A., irani D. Chronic fatigue syndrome: lactic acid bacteria may be of therapeutical value// *Med Hypotheses.* 2003, 60(6) 915-924.

41. В.М. Бондаренко, Т.В.Мацулеевич . Дисбактериоз кишечника как клиничко- лабораторный синдром. *Гэотар-Медиа* 2007. Стр 35-45.

42. Franco AT, et al. Activation of beta-catenin by carcinogenic *Helicobacter pylori* . *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005 год; 102 :10646–10651.

43. Franco AT, et al. Regulation of gastric carcinogenesis by *Helicobacter pylori* virulence factors. *Cancer Res.* 2008; 68 :379–387.

44. Ohnishi N, et al. Transgenic expression of *Helicobacter pylori* CagA induces gastrointestinal and hematopoietic neoplasms in mouse. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008; 105 :1003–1008.

45. van Doorn LJ, et al. Clinical relevance of the *cagA* , *vacA* , and *iceA* status of *Helicobacter pylori* . *Гастроэнтерология.* 1998 год; 115 :58–66.

46. Yamaoka Y, et al. Importance of *Helicobacter pylori* *oipA* in clinical presentation, gastric inflammation, and mucosal interleukin 8 production. *Гастроэнтерология.* 2002 год; 123 :414–424

- 47 Yamaoka Y, et al. Relationship between *Helicobacter pylori* iceA , cagA , and vacA status and clinical outcome: studies in four different countries. *J Clin Microbiol.* 1999 год; 37 :2274–2279.
48. Atherton JC. The pathogenesis of *Helicobacter pylori* -induced gastro-duodenal diseases. *Annu Rev Pathol Mech Dis.* 2006; 1 :63–96.
49. Kusters JG, van Vliet AH, Kuipers EJ. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clin Microbiol Rev.* 2006; 19 :449–490.
50. Boncristiano M, et al. The *Helicobacter pylori* vacuolating toxin inhibits T cell activation by two independent mechanisms. *J Exp Med.* 2003; 198 :1887–1897
51. Gebert B, Fischer W, Weiss E, Hoffmann R, Haas R. *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin inhibits T lymphocyte activation. *Science.* 2003; 301 :1099–1102.
52. Sundrud MS, Torres VJ, Unutmaz D, Cover TL. Inhibition of primary human T cell proliferation by *Helicobacter pylori* vacuolating toxin (VacA) is independent of VacA effects on IL-2 secretion. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2004; 101 :7727–7732.
53. Mimuro H, et al. *Helicobacter pylori* dampens gut epithelial self-renewal by inhibiting apoptosis, a bacterial strategy to enhance colonization of the stomach. *Cell Host Microbe.* 2007; 2 :250–263.
54. Oldani A, et al. *Helicobacter pylori* counteracts the apoptotic action of its VacA toxin by injecting the CagA protein into gastric epithelial cells. *PLoS Pathog.* 2009; 5 :e1000603
55. Tegtmeyer N, et al. Importance of EGF receptor, HER2/Neu and Erk1/2 kinase signaling for host cell elongation and scattering induced by the *Helicobacter pylori* CagA protein: antagonistic effects of the vacuolating cytotoxin VacA. *Cell Microbiol.* 2009; 11 :488–505.
56. Yokoyama K, et al. Functional antagonism between *Helicobacter pylori* CagA and vacuolating toxin VacA in control of the NFAT signaling pathway in gastric epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2005; 102 :9661–9666.
57. Figueiredo C, Machado JC, Yamaoka Y. Pathogenesis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter.* 2005; 10 (Suppl 1):14–20.
58. Yamaoka Y. Roles of *H. pylori* BabA in gastroduodenal pathogenesis. *World J Gastroenterol.* 2008; 14 :4265–4272.
59. Yamaoka Y, Kwon DH, Graham DY. AM(r) 34,000 proinflammatory outer membrane protein ( oipA ) of *Helicobacter pylori* . *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97 : 7533–7538.
60. Сафонова Н.В., Жеберун А.Б. Гастрит, язвенная болезнь и хеликобактериоз: Методическое пособие-СПб.,1993.-40с.
61. Radke M. *Helicobacter pylori*-Gastritis bei Kindern: Prävalenz, Symptomatik, Diagnostik und Therapie// *Pediatr. Prax.*-1994.-Bd.46.-P.233-243.
62. Fijimoto Y., Furusyo N., Toyoda K. et al. Intrafamilial transmission of *Helicobacter pylori* among the population of endemic areas in Japan // *Helicobacter.*-2007,-Vol.12.-P.170—176.

63. Graham D.Y. *Helicobacter pylori*: its epidemiology and its role in duodenal ulcer disease // *J. Gastroenterol.Hepatol.* -1991.-Vol.6.- P.105-113.
64. Iwao E, Yokoyama Y, Yamamoto K, Hirayama F, Haga K. In vitro and in vivo anti- *Helicobacter pylori* activity of Y-904, a new fluoroquinolone. *J Infect Chemother.* 2003; 9 :165–171.
65. Irie Y, Tateda K, Matsumoto T, Miyazaki S, Yamaguchi K. Antibiotic MICs and short time-killing against *Helicobacter pylori*: therapeutic potential of kanamycin. *J Antimicrob Chemother.* 1997; 40 :235–240.
66. Hoffman PS, Goodwin A, Johnsen J, Magee K, Veldhuyzen van Zanten SJ. Metabolic activities of metronidazole-sensitive and -resistant strains of *Helicobacter pylori*: repression of pyruvate oxidoreductase and expression of isocitrate lyase activity correlate with resistance. *J Bacteriol.* 1996; 178 :4822–4829.
67. Mégraud F, Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Rev.* 2007; 20 :280–322.
68. The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Breakpoint tables for interpretation of MICs and zone diameters. Version 3.1, 2013. Available from:
69. Craig WA. Pharmacokinetic/pharmacodynamic parameters: rationale for antibacterial dosing of mice and men. *Clin Infect Dis.* 1998; 26 :1–10; quiz 11-2.
70. Berry V, Jennings K, Woodnutt G. Bactericidal and morphological effects of amoxicillin on *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1995; 39 :1859–1861.
71. Mégraud F, Trimoulet pascale H, Boyanova L. Bactericidal effect of amoxicillin on *Helicobacter pylori* in an in vitro model using epithelial cells. *Antimicrob Agents Chemother.* 1991; 35 :869–872.
72. Lambert JR, Midolo P. The actions of bismuth in the treatment of *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 1997; 11 Suppl 1 :27–33.
73. Sörberg M, Hanberger H, Nilsson M, Nilsson LE. Pharmacodynamic effects of antibiotics and acid pump inhibitors on *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997; 41 :2218–2223.
74. Davis R, Bryson HM. Levofloxacin. A review of its antibacterial activity, pharmacokinetics and therapeutic efficacy. *Drugs.* 1994; 47 :677–700.
75. 28. Dore MP, Osato MS, Realdi G, Mura I, Graham DY, Sepulveda AR. Amoxicillin tolerance in *Helicobacter pylori*. *J Antimicrob Chemother.* 1999; 43 :47–54
76. van Zwet AA, Vandenbroucke-Grauls CM, Thijs JC, van der Wouden EJ, Gerrits MM, Kusters JG. Stable amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori*. *Lancet.* 1998; 352 :1595.
77. Kwon DH, Dore MP, Kim JJ, Kato M, Lee M, Wu JY, Graham DY. High-level beta-lactam resistance associated with acquired multidrug resistance in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003; 47 :2169–2178.
78. Mégraud F. *H pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut.* 2004; 53 :1374–1384.

79. Cattoir V, Nectoux J, Lascols C, Deforges L, Delchier JC, Megraud F, Soussy CJ, Cambau E. Update on fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*: new mutations leading to resistance and first description of a *gyrA* polymorphism associated with hypersusceptibility. *Int J Antimicrob Agents*. 2007; 29 :389–396.
80. Moore RA, Beckthold B, Wong S, Kureishi A, Bryan LE. Nucleotide sequence of the *gyrA* gene and characterization of ciprofloxacin-resistant mutants of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1995; 39 :107–111
81. Goodwin A, Kersulyte D, Sisson G, Veldhuyzen van Zanten SJ, Berg DE, Hoffman PS. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori* is due to null mutations in a gene (*rdxA*) that encodes an oxygen-insensitive NADPH nitroreductase. *Mol Microbiol*. 1998; 28 :383–393.
82. Jenks PJ, Edwards DI. Metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. *Int J Antimicrob Agents*. 2002; 19 :1–7.
83. Kwon DH, El-Zaatari FA, Kato M, Osato MS, Reddy R, Yamaoka Y, Graham DY. Analysis of *rdxA* and involvement of additional genes encoding NAD(P)H flavin oxidoreductase (*FrxA*) and ferredoxin-like protein (*FdxB*) in metronidazole resistance of *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44 :2133–2142.
84. Heep M, Beck D, Bayerdörffer E, Lehn N. Rifampin and rifabutin resistance mechanism in *Helicobacter pylori*. *Antimicrob Agents Chemother*. 1999; 43 :1497–1499.
85. Heep M, Rieger U, Beck D, Lehn N. Mutations in the beginning of the *rpoB* gene can induce resistance to rifamycins in both *Helicobacter pylori* and *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2000; 44 :1075–1077.
86. Goodwin CS, Marshall BJ, Blincow ED, Wilson DH, Blackbourn S, Phillips M. Prevention of nitroimidazole resistance in *Campylobacter pylori* by coadministration of colloidal bismuth subcitrate: clinical and in vitro studies. *J Clin Pathol*. 1988; 41 :207–210
87. Sachs G, Shin JM, Briving C, Wallmark B, Hersey S. The pharmacology of the gastric acid pump: the H<sup>+</sup>,K<sup>+</sup> ATPase. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 1995; 35 :277–305.
88. Besancon M, Simon A, Sachs G, Shin JM. Sites of reaction of the gastric H,K-ATPase with extracytoplasmic thiol reagents. *J Biol Chem*. 1997; 272 :22438–22446.
89. Huber R, Kohl B, Sachs G, Senn-Bilfinger J, Simon WA, Sturm E. Review article: the continuing development of proton pump inhibitors with particular reference to pantoprazole. *Aliment Pharmacol Ther*. 1995; 9 :363–378.
90. Abelö A, Andersson TB, Antonsson M, Naudot AK, Skånberg I, Weidolf L. Stereoselective metabolism of omeprazole by human cytochrome P450 enzymes. *Drug Metab Dispos*. 2000; 28 :966–972.
91. Kang JM, Kim N, Lee DH, Park YS, Kim JS, Chang IJ, Song IS, Jung HC. Effect of the CYP2C19 polymorphism on the eradication rate of *Helicobacter pylori* infection by 7-day triple therapy with regular proton pump inhibitor dosage. *J Gastroenterol Hepatol*. 2008; 23 :1287–1291.

92. Hunfeld NG, Touw DJ, Mathot RA, van Schaik RH, Kuipers EJ. A comparison of the acid-inhibitory effects of esomeprazole and rabeprazole in relation to pharmacokinetics and CYP2C19 polymorphism. *Aliment Pharmacol Ther.* 2012; 35:810–818.
93. Product Information: DEXILANT(R) delayed release oral capsules, dexlansoprazole delayed release oral capsules. Deerfield, IL: Takeda Pharmaceuticals America Inc.; 2010.
94. Cremonini F, Di Caro S, Covino M, Armuzzi A, Gabrielli M, Santarelli L, Nista EC, Cammarota G, Gasbarrini G, Gasbarrini A. Effect of different probiotic preparations on anti-helicobacter pylori therapy-related side effects: a parallel group, triple blind, placebo-controlled study. *Am J Gastroenterol.* 2002; 97 :2744–2749.
95. Cindoruk M, Erkan G, Karakan T, Dursun A, Unal S. Efficacy and safety of *Saccharomyces boulardii* in the 14-day triple anti-*Helicobacter pylori* therapy: a prospective randomized placebo-controlled double-blind study. *Helicobacter.* 2007; 12 :309–316.
96. Hurduc V, Plesca D, Dragomir D, Sajin M, Vandenplas Y. A randomized, open trial evaluating the effect of *Saccharomyces boulardii* on the eradication rate of *Helicobacter pylori* infection in children. *Acta Paediatr.* 2009; 98 :127–131.
97. Canducci F, Armuzzi A, Cremonini F, Cammarota G, Bartolozzi F, Pola P, Gasbarrini G, Gasbarrini A. A lyophilized and inactivated culture of *Lactobacillus acidophilus* increases *Helicobacter pylori* eradication rates. *Aliment Pharmacol Ther.* 2000; 14 :1625–1629.
98. Sachdeva A, Nagpal J. Effect of fermented milk-based probiotic preparations on *Helicobacter pylori* eradication: a systematic review and meta-analysis of randomized-controlled trials. *Eur J Gastroenterol Hepatol.* 2009; 21 :45–53
99. Fock KM, Katelaris P, Sugano K, Ang TL, Hunt R, Talley NJ, Lam SK, Xiao SD, Tan HJ, Wu CY, et al. Second Asia-Pacific Consensus Guidelines for *Helicobacter pylori* infection. *J Gastroenterol Hepatol.* 2009; 24 :1587–1600.
- 100 World Gastroenterology Organisation. World Gastroenterology Organisation Global Guideline: *Helicobacter pylori* in developing countries. *J Clin Gastroenterol.* 2011; 45 :383–388.
- 101 Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Atherton J, Axon AT, Bazzoli F, Gensini GF, Gisbert JP, Graham DY, Rokkas T, et al. Management of *Helicobacter pylori* infection--the Maastricht IV/ Florence Consensus Report. *Gut.* 2012; 61 :646–664.
- 102 Chey WD, Wong BC. American College of Gastroenterology guideline on the management of *Helicobacter pylori* infection. *Am J Gastroenterol.* 2007; 102 :1808–1825.
103. Cammarota G, Cianci R, Cannizzaro O, Cuoco L, Pirozzi G, Gasbarrini A, Armuzzi A, Zocco MA, Santarelli L, Arancio F, et al. Efficacy of two one-week rabeprazole/levofloxacin-based triple therapies for *Helicobacter pylori* infection. *Aliment Pharmacol Ther.* 2000; 14 :1339–1343.

104. Liou JM, Lin JT, Chang CY, Chen MJ, Cheng TY, Lee YC, Chen CC, Sheng WH, Wang HP, Wu MS. Levofloxacin-based and clarithromycin-based triple therapies as first-line and second-line treatments for *Helicobacter pylori* infection: a randomised comparative trial with crossover design. *Gut*. 2010; 59 :572–578.
105. Zullo A, Rinaldi V, Winn S, Meddi P, Lionetti R, Hassan C, Ripani C, Tomaselli G, Attili AF. A new highly effective short-term therapy schedule for *Helicobacter pylori* eradication. *Aliment Pharmacol Ther*. 2000; 14 :715–718.
106. Zullo A, Vaira D, Vakil N, Hassan C, Gatta L, Ricci C, De Francesco V, Menegatti M, Tampieri A, Perna F, et al. High eradication rates of *Helicobacter pylori* with a new sequential treatment. *Aliment Pharmacol Ther*. 2003; 17 :719–726.
107. Gatta L, Vakil N, Leandro G, Di Mario F, Vaira D. Sequential therapy or triple therapy for *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials in adults and children. *Am J Gastroenterol*. 2009; 104 :3069–379; quiz 1080.
108. Greenberg ER, Anderson GL, Morgan DR, Torres J, Chey WD, Bravo LE, Dominguez RL, Ferreccio C, Herrero R, Lazcano-Ponce EC, et al. 14-day triple, 5-day concomitant, and 10-day sequential therapies for *Helicobacter pylori* infection in seven Latin American sites: a randomised trial. *Lancet*. 2011; 378 :507–514.
109. Essa AS, Kramer JR, Graham DY, Treiber G. Meta-analysis: four-drug, three-antibiotic, non-bismuth-containing “concomitant therapy” versus triple therapy for *Helicobacter pylori* eradication. *Helicobacter*. 2009; 14 :109–118.
110. Wu DC, Hsu PI, Wu JY, Opekun AR, Kuo CH, Wu IC, Wang SS, Chen A, Hung WC, Graham DY. Sequential and concomitant therapy with four drugs is equally effective for eradication of *H pylori* infection. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 2010; 8: 36–41.e1.