

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

ГОСУДАРСТВЕННОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «РЕСПУБЛИКАНСКИЙ НАУЧНО-ПРАКТИЧЕСКИЙ ЦЕНТР РАДИАЦИОННОЙ МЕДИЦИНЫ И ЭКОЛОГИИ ЧЕЛОВЕКА»

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ «ГОМЕЛЬСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»

А.В. Воропаева, А.Е. Силин, А.Д. Борсук, Е.В. Воропаев, Э.Н.Платошкин

**ПРОБЛЕМА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ
HELICOBACTER PYLORI
СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД**

Практическое пособие для врачей



Гомель, ГУ «РНПЦ РМ и ЭЧ» 2018

УДК: 616.33-076:579.835.12 (075.8)

Рекомендовано Ученым советом ГУ «РНПЦ РМиЭЧ» в качестве практического пособия для врачей от 5.12.2018г., протокол № 12.

Составители: Воропаева А.В., врач лабораторной диагностики лаборатории клеточных технологий ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», кандидат биологических наук, доцент, Силин А.Е., заведующий лабораторией молекулярной генетики ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», кандидат биологических наук, Борсук А.Д., заведующий эндоскопическим отделением ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», Воропаев Е.В., проректор по научной работе УО «Гомельский государственный медицинский университет», кандидат медицинских наук, доцент, Платошкин Э.Н., заведующий кафедрой внутренних болезней №2 с курсом ФПКиП УО «Гомельский государственный медицинский университет», кандидат медицинских наук, доцент.

Рецензенты:

заведующий терапевтическим отделением для участников ликвидации и потерпевших от последствий катастрофы на ЧАЭС ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», Кортаев А.В., кандидат медицинских наук, доцент

декан медико-диагностического факультета УО «Гомельский государственный медицинский университет» доктор медицинских наук, доцент В.М. Мицура,

доцент кафедры эпидемиологии и микробиологии ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования» кандидат медицинских наук А.Н. Волченко

ПРОБЛЕМА АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ *HELICOBACTER PYLORI*: СОВРЕМЕННЫЙ ВЗГЛЯД : практическое пособие для врачей. А.В.Воропаева [и др.] – Гомель: ГУ «РНПЦ РМ и ЭЧ», 2018. – 25 с.

В практическом пособии представлены методы определения резистентности *Helicobacter pylori* к основным применяемым для лечения антибактериальным средствам.

Пособие предназначено для врачей лабораторной диагностики, бактериологов, гастроэнтерологов, терапевтов, врачей общей практики, научных работников

© Составители: Воропаева А.В., Силин А.Е., Борсук А.Д., Воропаев Е.В., Платошкин Э.Н. 2018

ГУ «РНПЦ РМиЭЧ», 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ	4
АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ	5
1. ТЕРАПИЯ ИНФЕКЦИИ <i>H. PYLORI</i>	6
2. ПРАВИЛА ЗАБОРА БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА	7
3. МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ ИНФЕКЦИИ <i>H. PYLORI</i>	8
4. МЕХАНИЗМ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ <i>H. PYLORI</i>	8
4.1 Резистентность <i>H. pylori</i> к производным нитроимидазола	8
4.2 Резистентность <i>H. pylori</i> к амоксициллину	9
4.3 Резистентность <i>H. pylori</i> к тетрациклину	11
4.4 Резистентность <i>H. pylori</i> к кларитромицину	12
4.5 Резистентность <i>H. pylori</i> к фторхинолонам.....	14
4.6 Резистентность <i>H. pylori</i> к нитрофуранам.....	15
4.7 Резистентность <i>H. pylori</i> к рифампицину.....	15
5 МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ.....	15
5.1 Микробиологические методы определения антибиотикоустойчивости	15
5.2 Молекулярные методы определения антибиотикоустойчивости ..	16
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	22
Литература.....	23

ПЕРЕЧЕНЬ УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

ДНК	дезоксирибонуклеиновая кислота
ИПП	ингибиторы протонной помпы
МИК	минимальная ингибирующая концентрация
п.н.	пары нуклеотидов
РЖ	рак желудка
рРНК	рибосомная рибонуклеиновая кислота
СОЖ	слизистая оболочка желудка
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>

АКТУАЛЬНОСТЬ ПРОБЛЕМЫ

Современные требования относительно клиники, диагностики и лечения *H. pylori* с позиций доказательной медицины представлены в материалах Маастрихт V/Флорентийского консенсуса 2015 г. Отмечено, что повышение роста резистентности *H. pylori* к ранее эффективным схемам антибактериального лечения вызывает большое беспокойство и требует доработки терапевтических стратегий с учетом оценки результатов чувствительности популяционных и индивидуальных данных к лекарственным средствам, применяемым для эрадикации. Препаратами выбора при лечении *H. pylori*-инфекции являются кларитромицин, метронидазол, амоксициллин и тетрациклин. В качестве альтернативных препаратов используют фторхинолоны (ципрофлоксацин, моксифлоксацин, тровафлоксацин и левофлоксацин), нитрофураны (фуразолидон, нитрофурантоин, энтерофурил), рифампицин. Следует отметить, что ни один из вышеперечисленных лекарственных препаратов, применяемых в виде «монотерапии», не является эффективным. Бактерия приобретает устойчивость ко всем антибиотикам, применяемым для эрадикации, в результате образования точечных мутаций [1].

Для определения устойчивости *H. pylori* используют традиционный микробиологический, а также молекулярно-генетический методы диагностики. Применение молекулярно-генетических методов в данном случае имеет особое значение, так как *H. pylori* является труднокультивируемым, медленно-растущим микроорганизмом. Очень важно проводить генетический анализ для выявления новых точечных мутаций и разрабатывать методики их определения, что позволит проводить оценку уровня резистентности в регионе [2].

ТЕРАПИЯ ИНФЕКЦИИ *H. PYLORI*

Не каждому пациенту, инфицированному *H. pylori*, требуется назначать лечение. Европейская рабочая группа по изучению *H. pylori* (EHPSG, 2012 г.) поставила одной из своих задач выработку и утверждение согласительных рекомендаций, в которых на основании анализа постоянно накапливающихся данных вырабатываются конкретные установки, касающиеся диагностики инфекции и лечения больных, у которых она обнаружена. Данные рекомендации приняты Маастрихт IV и V консенсусами [1].

К показаниям, при которых обязательно рекомендуется проводить эрадикационную терапию, относятся ЯБЖ и ЯБДК (независимо от стадии течения), включая неосложненные формы, MALT-лимфома, хронический гастрит, вызванный инфекцией *H. pylori*, в т. ч. атрофический, пациенты, перенесшие резекцию желудка по поводу рака и после эндоскопической резекции ранних злокачественных новообразований желудка, родственники больных раком желудка первой степени родства, пациенты, желающие провести эрадикацию после консультации с лечащим врачом, функциональная диспепсия (особенно в регионах с высокой инфицированностью *H. pylori*), гастроэзофагеальная рефлюксная болезнь (у пациентов, продолжительно принимающих ИПП), НПВП-гастропатии [1, 2].

Рекомендовано проведение эрадикационной терапии больным с аутоиммунной тромбоцитопенией и железодефицитной анемией при отсутствии других причин ее развития. Согласно Киотскому глобальному консенсусу по *H. pylori*-ассоциированному гастриту, состоявшемуся в сентябре 2015 г., всем лицам, инфицированным *H. pylori*, должна быть предложена эрадикационная терапия, если для этого нет каких-либо препятствий (коморбидность, высокая вероятность реинфекции в популяции). Терапия *H. Pylori*-инфекции направлена на тотальное уничтожение бактерий [3], иначе из отдельных выживших после окончания антибактериальной терапии микробных клеток начнется новая

КОЛОНИЗАЦИЯ.

ПРАВИЛА ЗАБОРА БИОЛОГИЧЕСКОГО МАТЕРИАЛА

Хотя ИПП не оказывают прямого антимикробного эффекта, они косвенно сталкиваются с распределением *H. pylori* в желудке, изменяя бактериальную нишу и приводя к исчезновению бактерии в полости желудка.

Взятие биоптатов для молекулярно-генетического исследования проводят во время фиброгастроуденоскопии с прицельной биопсией слизистой оболочки антрального отдела и тела желудка. Полученный биологический материал (кусочки ткани объемом не более 5 мм) вносят в стерильные полипропиленовые пробирки объемом 1,5 мл типа «Eppendorf», содержащие 200 мкл стерильного физиологического раствора. Пробирки с пробами плотно закрывают, маркируют и транспортируют в лабораторию. При невозможности немедленной доставки проб их сохраняют в холодильнике при температуре 2–8°C в течение 3-х суток.

Далее проводят выделение тотальной ДНК по соответствующим методикам.

При заборе биоптатов СОЖ для микробиологического исследования биоптаты СОЖ, включая анtrum и тело, помещают в пробирки с транспортной средой «Portagerm pylori» (BioMerieux, Франция), содержащей селективные добавки, состоящие из антибактериальных и противогрибковых препаратов, способных подавлять рост сопутствующей или контаминационной микрофлоры, и транспортируют в лабораторию.

Кровь для проведения исследований методом ИФА забирают из локтевой вены одноразовой иглой утром натощак или не менее чем через три часа после приема пищи в специальную вакуумную систему типа «Vacurette» с ЭДТА. Пробирку после взятия крови плавно перемешивают, переворачивая вверх дном, чтобы кровь перемешалась с антикоагулянтом. Затем пробирки с цельной кровью центрифугируют при 3000g в течение 20 минут при комнатной температуре. Образовавшуюся плазму крови отбирают в количестве

не менее 1 мл отдельными наконечниками с аэрозольными фильтрами в пробирки объемом 1,5 мл типа «Eppendorf» и хранят при температуре минус 16–20°C [4].

МЕТОДЫ ЛАБОРАТОРНОЙ ДИАГНОСТИКИ *H.PYLORI*

Среди всего многообразия методов диагностики *H. pylori* выделяют две большие их группы – инвазивные и неинвазивные методы. К инвазивным методам относятся: бактериологический метод, гистологический метод, быстрый уреазный тест, ПЦР, фазово–контрастная микроскопия. Неинвазивные методы представлены серологическим методом, ПЦР, уреазным дыхательным тестом.

МЕХАНИЗМ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ *H.PYLORI*

Резистентность *H. pylori* к производным нитроимидазола (метронидазол, тинидазол)

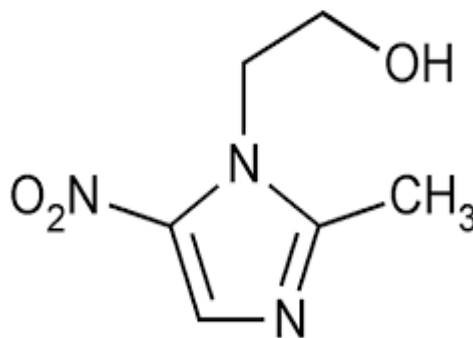


Рисунок 1 – Химическая структура молекулы метронидазола

В 1957 г. специалисты французской компании Rhone Poulenc (в настоящее время Sanofi) получили формулу метронидазола и установили его высокую трихомонадоцидную активность. Далее в 70-е гг. случайным образом были обнаружены антибактериальные свойства метронидазола, и препарат начали применять для лечения бактериальных инфекций мочевых путей,

дыхательных органов, кожи и желудочно-кишечного тракта. В 2000-х гг. список показаний противомикробного средства пополнила язвенная болезнь желудка, в развитии которой важную роль играет бактерия *H. pylori*, на которую губительно воздействует метронидазол.

Резистентность *H. pylori* к производным нитроимидазола имеет довольно широкие географические границы. Особенно много устойчивых к метронидазолу штаммов находится в Европе (19–42%), в США (33–37 %), в Японии (9–12%), в Бразилии и Мексике (53%, 77% соответственно). В России уровень первичной резистентности *H. pylori* к метронидазолу в среднем 35,8% [5, 6].

Механизмы устойчивости *H. pylori* к производным нитроимидазола мало изучены. Считается, что основной причиной резистентности к этой группе препаратов является невозможность антибактериального соединения преобразоваться в свою активную форму. Причинами данного феномена могут быть точечные мутации гена *rdxA*, кодирующего кислород-нечувствительную нитроредуктазу, а также вставка инсерционной последовательности (мини IS605) или делеция в гене *rdxA*, точечные мутации в генах *frxA* и *fdxB*. Тем не менее, описаны случаи резистентности *H. pylori* к производным нитроимидазола, не связанные с мутациями *rdxA* и *frxA*, предположительно образующиеся ввиду низкой активности NADH-оксидазы или механизма эффлюкса [6, 7].

Резистентность *H. pylori* к Амоксициллину

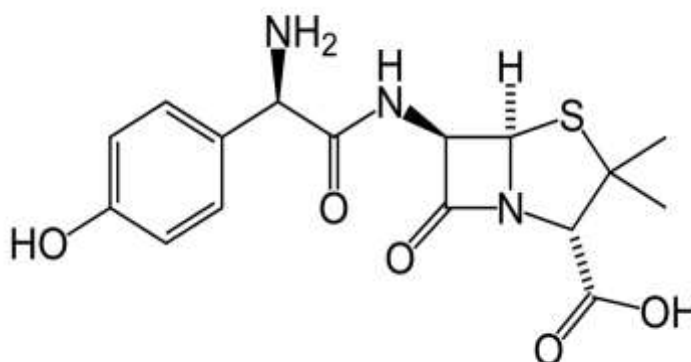


Рисунок 2 – Химическая структура молекулы амоксициллина

Включение гидроксильной группы в боковую цепочку ампициллина привело к созданию в 1972 г. британской компанией Beecham (GlaxoSmithKline в настоящее время) амоксициллина. Амоксициллин обладал мощной, быстрой, с широким спектром бактерицидной активностью и имел высокую пероральную абсорбцию, обуславливая в плазме крови концентрации примерно в два раза выше, чем ампициллин. В 2002 г. европейские эксперты рекомендовали применять амоксициллин для лечения хеликобактерной инфекции [6].

Устойчивость к амоксициллину в Европе регистрируется крайне редко и в среднем не превышает 1% [1]. Во время проведения европейского мультицентрового исследования антибиотикорезистентности в Италии, Германии и Великобритании были впервые зарегистрированы уровни резистентности *H. pylori* к амоксициллину (8,2%, 4,0% и 1,2% соответственно). Тем не менее, некоторые исследователи показывают очень высокие параметры устойчивости, например 72% в Китае и 29% в Бразилии.

Основной причиной резистентности *H. pylori* к амоксициллину являются мутации в гене *rbp1A*, кодирующем пенициллинсвязывающий белок 1А (РВР1), ответственный за катализацию терминальной стадии образования пептидогликана клеточной стенки бактерий [6]. С резистентностью ассоциированы три вариации замены аминокислот (Ser 414 на Arg, Thr 556 на Ser и Asn 562 на Tyr) в структуре белка. Также описаны точечные мутации генов, кодирующих другие семейства пенициллинсвязывающих белков (РВР2, РВР3 и РВР4). Кроме того, определенную роль в формировании резистентности *H. pylori* к амоксициллину могут играть механизмы, задействованные в снижении проницаемости наружной мембраны микроорганизма [6, 7,8].

Резистентность *H. pylori* к тетрациклину

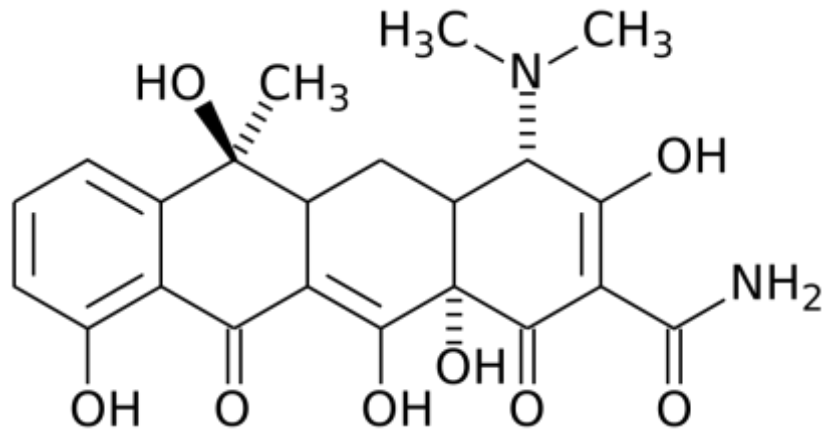


Рисунок 3 – Химическая структура молекулы тетрациклина

Тетрациклин – поликетидный антибиотик широкого спектра, продуцируемый родом актинобактерий *Streptomyces*. Включен в список основных лекарственных средств Всемирной организации здравоохранения, перечень наиболее важных медикаментов, необходимых в базовой системе здравоохранения. Первый из тетрациклинов (Ауреомицин или хлортетрациклин) был обнаружен в виде натуральных продуктов Бенджамином Даггаром в лаборатории Ледерле (США) в 1945 г., далее в 1949 году исследователи из Pfizer выделили окситетрациклин и затем в 1953 году тетрациклин [8].

В Европе, Австралии и США резистентность *H. pylori* к тетрациклину незначительна: 2,1%-2,7%. В России тетрациклин-резистентные штаммы *H. pylori* не выявлены [6]. Однако в исследованиях, особенно из азиатских стран, сообщается о возрастающей устойчивости к тетрациклину. Так, в Корее устойчивость к тетрациклину примерно 5%, в Японии 6,7%. В Шанхае (Китай) прогнозируется до 59% устойчивых к тетрациклину штаммов *H. pylori* [8]. В течение последних лет были описаны четыре различных механизма резистентности бактерий к тетрациклину: активное выведение (эффлюкс),

Устойчивость кларитромицина к гидролизующему действию соляной кислоты в 100 раз выше, чем у эритромицина, однако максимальный антибактериальный эффект препарат проявляет при pH 7,0-7,4. Кларитромицин – препарат выбора при лечении хеликобактерной инфекции (гастрит, язвенная болезнь), инфекций органов дыхания, ЛОР–органов (включая коклюш), кожи и мягких тканей, хламидиоза, микобактериоза при СПИД [8]. Анализ полученных на сегодняшний день данных показывает, что чувствительность и резистентность к кларитромицину приводят к эрадикации от 81–95% и 0–48% соответственно. Устойчивость к кларитромицину составляет в США и Японии около 13%, в странах Северной Европы 4,4%, Центральной Европы 8,7% и Южной Европы 24%. Последние проведенные в России исследования показали, что уровень устойчивости к кларитромицину выделенных штаммов *H. pylori* среди детей Санкт–Петербурга составил 39,2%, что в 2 раза превышает средние данные по России, и примерно в 3 раза средние данные по странам Европы [8, 9]. В Республике Беларусь отмечен уровень первичной резистентности *H. pylori* к кларитромицину – 5,2% (Воропаева А.В.) и резистентности 15,2% (Янович О.А.).

Так как кларитромицин является широко применяемым препаратом, количество устойчиво резистентных к нему штаммов хеликобактерий непрерывно увеличивается. Резистентность *H. pylori* к кларитромицину обусловлена главным образом заменой аденина на гуанин в позициях 2142 и 2143 и трансверсией аденина на цитозин в позиции 2142, которые включены в пептидилтрансферазный цикл 23S rRNA. Мутация А к G в положении 2142 или в положении 2143 и мутация А к С в положении 2142 наиболее часто встречаются в резистентных штаммах *H. pylori* Европы и Азии и составляют 69,8%, 11,7% и 2,6% соответственно. Мутация Т к С в положении 2717 зарегистрирована итальянскими исследователями и составляет 3,6%. Клиническую значимость мутации T2182C в развитии резистентности к кларитромицину определили Корейские исследователи. Данный тип резистентности получил название MLS–типа, поскольку он лежит в основе

устойчивости бактерий не только к макролидам, но и к таким антибиотикам, как линкосамиды и стрептограминны. Резистентность такого типа может быть как природной (конститутивной), так и приобретенной (индуцибельной). *H. pylori* содержит две копии гена 23S рРНК и мутации, как правило, содержатся в обеих копиях, однако предполагается наличие мутаций и в одной из копий. Чаще такие мутации связаны с низким уровнем резистентности к кларитромицину. Мутации в одной из копий гена 23S рРНК могут быть легко переданы другим копиям 23S рРНК за счет рекомбинации ДНК, придавая высокий уровень устойчивости к кларитромицину. А2142G и А2142С мутантные генотипы характеризуются высоким уровнем перекрестной резистентности ко всем макролидам, в то время как мутантный генотип А2143G связан с высоким уровнем резистентности к эритромицину и средним уровнем резистентности к клиндамицину и стрептограмину[10].

Резистентность *H. pylori* к фторхинолонам

Фторхинолоны действуют бактерицидно благодаря ингибированию ферментов класса топоизомераз – ДНК–гиразы (топоизомеразы II) и топоизомеразы IV. Эти ферменты выполняют строго определенные функции в процессе формирования пространственной структуры молекулы ДНК при ее репликации: ДНК–гираза катализирует расплетение (отрицательную суперспирализацию) нитей ДНК, а топоизомеразы IV участвует в разъединении (декатенации) ковалентно–замкнутых кольцевых молекул ДНК. Ингибирование этих ферментов нарушает процессы роста и деления бактериальной клетки, что приводит к ее гибели. Основной мишенью действия фторхинолонов в грамотрицательных микроорганизмах является ДНК–гираза. Большинство штаммов *H. pylori* восприимчивы к фторхинолонам.

Резистентность *H. pylori* к левофлоксацину и ципрофлоксацину достаточно высокая во Франции – 17%, Бельгии – 16,8%, Португалии – до 20,9%, Италии – до 20%, Германии – 9,5%. Изучение резистентности штаммов *H. pylori*, собранных в Японии с 2001 по 2004 годы, показало, что 15%

устойчивы к фторхинолонам. Кроме того, большинство фторхинолон–устойчивых штаммов также устойчивы к метронидазолу и кларитромицину. Анализ развития устойчивости *H. pylori* к фторхинолонам свидетельствует о том, что данная группа лекарственных препаратов не может являться «спасительной» терапией [11].

Резистентность *H. pylori* к нитрофуранам

Нитрофураны (фуразолидон, нитрофурантоин, энтерофурил) действуют как ингибитор моноаминоксидазы и препятствуют инактивации тирамина под действием моноаминоксидазы печени. Механизм устойчивости нитрофуранов отличается от метронидазола, поскольку инактивация *rdxA*, *frxA* и *fdxB* генов не привела к устойчивости [12].

Резистентность *H. pylori* к рифампицину

Рифабутин и некоторые другие производные рифампицина ингибируют ДНК–зависимую РНК – полимеразу *gro B*–гена на этапе инициации транскрипции. Устойчивость *H. pylori* к рифампицину связана с различными точечными мутациями в *gro B*–гене, соответствующих 149, 524–545 и 586 кодомам. На сегодняшний день резистентность *H. pylori* к рифампицину менее 1% [12].

МЕТОДЫ ВЫЯВЛЕНИЯ АНТИБИОТИКОУСТОЙЧИВОСТИ

Микробиологические методы определения антибиотикоустойчивости

1. **Метод разведения в агаре** предложен Институтом клинических лабораторных стандартов (CLSI), США, для определения чувствительности *H. pylori* к кларитромицину и Европейской рабочей группой по изучению *H. pylori*. Метод успешно использовался для прогнозирования применения схемы эрадикации кларитромицин – амоксициллин – ИПП, однако не пригоден для применения в практической лаборатории обычной клиники, так как имеет существенные недостатки: сложен в исполнении, трудоемок, требует опыта персонала [13].

2. **Метод разведения в жидкой питательной среде** разработан для *H. pylori* при использовании бульона Мюллера–Хинтона [13].

3. **Метод контрольных точек** является упрощенной версией метода разведения в агаре. При этом в агар вносят АМП, создающие концентрации, соответствующие контрольным точкам МИК, например, 1 мкг/мл для кларитромицина, или две различных концентрации (0,25 мкг/мл и 1 мкг/мл), чтобы выделить чувствительные, промежуточные или устойчивые штаммы. Применение данного метода позволило установить уровень резистентности штаммов *H. pylori* к кларитромицину 6,3%, амоксициллину 1,4%, метронидазолу 23,8%, левофлоксацину 24,5%, тетрациклину 0,7% [13].

4. **Диско–диффузионный метод** является самым простым и наиболее экономичным для обычного определения чувствительности. Однако его не рекомендуется применять из–за непостоянства создаваемого градиента концентрации медленно растущей *H. pylori* [13].

5. **Метод E–тестов** экономически эффективен при определении чувствительности единичных штаммов для индивидуальной терапии, а также мониторинге резистентности при разработке схем эффективной эмпирической терапии из-за простоты постановки и низкой стоимости [14].

Молекулярные методы определения антибиотикоустойчивости

Поскольку резистентность *H. pylori* к антибиотикам связана с образованием специфических точечных мутаций, молекулярные методы, основывающиеся на их выявлении, представляют собой привлекательную альтернативу обычным культуральным методам.

Молекулярные методы не зависят от жизнеспособности клеток или темпа роста бактерий, а, следовательно, более последовательны и воспроизводимы. Кроме того, использование молекулярных методов позволяет получить быстрый результат при исследовании различного биологического материала, в том числе биоптатов СОЖ. Анализ генетических последовательностей

(секвенирование) ДНК является «золотым» стандартом для обнаружения мутаций, однако данный метод не является доступным и экономически эффективным в практических лабораториях.

Молекулярные методы определения резистентности к метронидазолу разработаны на основе выявления RdxA белка посредством иммуноблотинга со специфическими анти-RdxA антителами. Положительная реакция образования иммунокомплекса соответствует метронидазол-чувствительным штаммам и отсутствует в большинстве (90%) метронидазол-устойчивых [14, 15].

Многочисленные молекулярно-генетические методы для определения устойчивости *H. pylori* к кларитромицину основаны на использовании ПЦР [16].

Полиморфизм длин рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДФ) является простым методом, основанным на последующем расщеплении ампликона соответствующей рестриктазой. Метод ПЦР-ПДФ является «золотым стандартом» для идентификации однонуклеотидных замен и по заключению экспертов Международной федерации клинической химии и лабораторной медицины [17] обладает 100% специфичностью.

Достоинства и недостатки метода: Благодаря простоте и надёжности метод получил широкое распространение и до сих пор популярен, хотя и имеет некоторые ограничения. Во-первых, он позволяет детектировать только SNPs, расположенные в сайтах рестрикции, во-вторых, годится лишь для детекции уже известных мутаций. Этот метод делает возможным обнаружение мутаций в 23S рРНК гена *H. pylori* при помощи рестриктаз: MboII (A2142G), BsaI (A2143G), VseAI (A2142C), HhaI (T2717C) [16, 18].

3'-мистматч ПЦР с использованием обратных праймеров (3MPCR) разработана для выявления точечной мутации A2142C.

Недостатки метода: Данная методика применима только при работе с препаратами ДНК, выделенными из бактериальных культур [19].

Лигирование олигонуклеотидных зондов (PCR-oligonucleotide ligation assay – OLA) – метод детекции состояния гена, основанный на дотировании

синтетических олигонуклеотидных зондов. При проведении этих реакций специфические ДНК- или РНК-последовательности исследуют путем использования их в качестве матрицы для ковалентного связывания двух пар олигонуклеотидных зондов. ДНК-зонды для лигирования подбирают таким образом, чтобы они были полностью комплементарны нормальному фрагменту ДНК в области локализации мутации, причем сама нуклеотидная замена должна находиться на стыке двух праймеров. Обычно в один из зондов вводят флуоресцентную метку, а другой метят биотином. После гибридизации при строго стандартных условиях синтезированные олигонуклеотидные последовательности сшивают ДНК-лигазами из термофильных микроорганизмов. Такие ферменты работают при высоких температурах и сохраняют свою активность в условиях, необходимых для проведения денатурации молекул ДНК. При наличии мутации в тестируемой молекуле ДНК на конце одного из зондов образуется сайт некомплементарного спаривания, непосредственно примыкающий к месту лигирования. Наличие терминального неспаренного основания в смежно-расположенных последовательностях ДНК-зондов резко снижает скорость лигирования, и при определенных условиях проведения реакции сшивки между зондами в этом случае не происходит. Метод включает несколько последовательных циклов гибридизации, лигирования и денатурации. Начиная со второго цикла, матричной ДНК для гибридизации зондов наряду с тестируемой пробой служат также дотированные последовательности.

В дальнейшем проводят электрофоретический / капиллярный анализ меченых одностранных фрагментов ДНК [20].

Достоинства и недостатки метода: Подходит для анализа единичных образцов по большому количеству полиморфных маркеров для диагностических целей, однако проведение исследования требует высокой квалификации персонала и дорогостоящего оборудования.

Другие методы детекции SNPs, такие как DNA enzyme immunoassay (DEIA), PCR preferential homoduplex formation assay (PHFA), PCR line probe

assay (LiPA) так же, как и OLA, включают дополнительный этап гибридизации после проведения ПЦР. Продукты ПЦР гибридизируют с мечеными олигонуклеотидными зондами, иммобилизованными в микротитровальных планшетах (DEIA, PHFA) или шариках из нитроцеллюлозы (LiPA), при определенном режиме, и продукты гибридизации выявляются колориметрически с помощью специфических моноклональных антител и стрептавидин=щелочной фосфатазы.

Достоинства и недостатки методов: Методы позволяют проводить тестирование дикого типа *H. pylori* и 3-х точечных мутаций – A2142C, A2142G и A2143G в препаратах ДНК, выделенных из бактериальных культур и биоптатов СОЖ. PCR line probe assay (LiPA) является более простым в исполнении методом и позволяет одновременно исследовать большое количество проб. Проведенное многонациональное исследование в различных географических регионах (Европа, Австралия, Африка) показало высокое (97%) прогнозное значение при тестировании устойчивых к кларитромицину штаммов *H.pylori* и позволило выявить точечные мутации A2143G (45%), A2142G (33%) и A2142C (2%). Параллельно с определением устойчивости возможно проводить и определение патогенных характеристик, таких как *сag A* или *vacA*–генотипы. Метод PCR preferential homoduplex formation assay (PHFA) позволяет отдельно определять дикие и мутантные генотипы *H. pylori* [20].

К недостаткам методов относят необходимость наличия в лаборатории специального оборудования и реагентов для проведения исследований.

Аллель-специфичная ПЦР в режиме реального времени (Real time PCR hybridisation assay using the LightCycler) разработана для определения точечных мутаций, определяющих устойчивость к кларитромицину. Диагностика основана на использовании флуоресцентных зондов «Scorpions». В реакционную смесь вводят два аллель-специфичных праймера ("норма" и "мутация"), каждый из которых содержит 3'-нуклеотид, комплементарный одному из вариантов полиморфного основания. С праймерами связаны флуоресцентные зонды, содержащие последовательность участка ампликона и

шпильку. В результате проведения амплификации ДНК–полимераза с разной эффективностью достраивает аллель–специфичные праймеры, что приводит к различному накоплению флуоресцентного сигнала от зондов для «нормы» и «мутации», а протекание реакции в одной пробирке дает возможность добиться характеристик набора, недостижимых для методов на основе SybrGreen и TaqMan.

Достоинства и недостатки метода: Строение зондов «Scorpions» обеспечивает лучшее соотношение сигнал/шум среди всех методов флуоресцентной детекции, мономолекулярный механизм реакции увеличивает чувствительность и качество детекции, а использование специфичных зондов позволяет исключить ложноположительные результаты, возможные для методик на основе интеркалирующих красителей, таких как SybrGreen I или универсальных зондов Cy5 [21].

К недостаткам метода относят возможность определения только мутаций А к G, и, так же как и в предыдущем случае, необходимость наличия в лаборатории специального оборудования (Roche instrument) и весьма дорогостоящих реагентов для проведения исследований.

Существует также возможность определять устойчивость к кларитромицину без проведения ПЦР, с помощью **флуоресцентной гибридизации «на месте» (FISH)**. В этом случае гибридизации с флуоресцентномечеными зондами подвергаются 16S и 23S рРНК *H. pylori*. Помеченные зондами бактерии впоследствии визуализируют с использованием флуоресцентной микроскопии.

Достоинства и недостатки метода: Этот тест делает возможным выявление *H. pylori* и кларитромицинрезистентности одновременно. Кроме того, FISH–гибридизация не требует длительной подготовки образцов и может применяться при исследовании биоптатов непосредственно после проведения биопсии. К недостаткам метода следует отнести необходимость наличия в лаборатории специального оборудования (флуоресцентный микроскоп для визуализации результатов исследования). Данный метод позволяет проводить

тестирование только точечных мутаций A2142G и A2143G [22].

Пиросеквенирование (pyrosequencing или DNA sequencing by conventional and real time techniques) – одна из методик секвенирования ДНК, позволяющая определить последовательности нуклеиновой кислоты. При выполнении методики «секвенирование – синтез» используется ряд ферментативных реакций, позволяющих точно обнаружить короткие последовательности нуклеиновой кислоты во время синтеза ДНК. Методика пиросеквенирования широко используется при генотипировании SNP, идентификации бактерий, грибов и типировании вирусов.

Достоинства и недостатки метода: Пиросеквенирование является одним из самых быстрых методов определения однонуклеотидных замен – в течение 20 мин. возможно проанализировать 96 образцов.

Недостаток метода – ограничение по длине анализируемой ДНК; в отличие от метода терминации цепей (Сэнжера) возможно секвенирование только 300–500 нуклеотидов. Кроме того, необходимость наличия дорогостоящего оборудования и реагентов для проведения исследований делает данный метод малодоступным [23, 24].

Определение устойчивости к тетрациклину проводят с использованием ПЦР–ПДРФ и ПЦР в реальном времени. Эти же методы используют и для определения устойчивости к ципрофлоксацину [25, 26].

Секвенирование ДНК методом Сэнжера. Метод состоит из двух этапов: первый – секвенирующая реакция с применением меченых красителями дидеооксинуклеотидтрифосфатов, второй – электрофоретическое фракционирование полученных меченых фрагментов различной длины с последующей детекцией. В ходе секвенирующей реакции происходит ферментативный синтез полидезоксирибонуклеотидов с помощью ДНК–полимераз, заключающийся в копировании исходного образца, структура которого изучается. По своей структуре секвенирующая реакция сходна с ПЦР. В ней циклически чередуются этапы денатурации, отжига и элонгации. В отличие от ПЦР в секвенирующей реакции используется один праймер – идёт

копирование только одной цепочки ДНК исследуемого образца, и получаемые копии не являются матрицами для синтеза на последующих циклах. Накопление конечного продукта происходит не в геометрической, а в арифметической прогрессии. Полученные в реакции секвенирования флуоресцентно меченные одноцепочечные фрагменты ДНК разделяют с помощью электрофореза в 4–7% денатурирующем поли-акриламидном геле, содержащем 7М мочевины. Наиболее эффективным является проведение электрофореза в капиллярах. Капилляр представляет собой стеклянную трубку длиной 30–100 см, закатанную в полимерный пластификатор. Небольшой диаметр капилляра (50–100 мкм) позволяет проводить разделение значительно быстрее, чем в обычных гелях. Кроме того, капиллярные секвенаторы позволяют обеспечивать гораздо более высокую чувствительность за счет отсутствия горизонтальной диффузии [27].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка и внедрение современных эффективных методов лабораторной диагностики являются определяющими в борьбе с хеликобактериозом. Молекулярно–генетические методы, такие как ПЦР и генетический анализ, при определении устойчивости к применяемым антимикробным препаратам должны выявлять мутации в генах, определяющих резистентность в конкретном регионе, что обеспечит целесообразность использования препаратов, а также позволит проводить динамическое наблюдение за уровнем резистентности.

В предложенном пособии приведены сведения о существующих на данный момент методиках выявления *H. pylori*-инфекции и собственный опыт лабораторных исследований. Разработка путей оптимизации диагностики *H. pylori* является актуальной проблемой.

ЛИТЕРАТУРА

1. Management of *Helicobacter pylori* infection – the Maastricht V/Florence Consensus Report / P. Malfertheiner [et al.] // *Gut*. – 2017. – Vol. 66. – P. 6–30.
2. Воропаева, А.В. Определение резистентности *Helicobacter pylori* к кларитромицину методом ДНК–маркирования / А.В. Воропаева // *Проблемы здоровья и экологии*. – 2008. – № 4. – С. 86–91.
3. The Toronto Consensus for the Treatment of *Helicobacter pylori* Infection in Adults / C.A Fallone [et al] // *Gastroenterology*. – 2016. –Vol. 151(1). – P. 51–69.
4. Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности / Методические указания МУ 1.3.1794-03, МУ 1.3.1794-04. – Минздрав России. – 2003. – Приложение 7.
5. Лечение инфекции *Helicobacter pylori*: мейнстрим и новации / В.Т. Ивашкин [и др.] // *Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол*. – 2017. – № 27(4). – С. 4–21.

6. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: An updated appraisal / V.D. Francesco [et al.] // *World J. Gastrointest. Pathophysiol*. – 2011. – №2. – Т. 3. –P. 35–41.
7. Wueppenhorst, N. European Multicenter Study on Antibiotic Susceptibility of *H. pylori* 2008–2009 – Data from the National Reference Centre for *Helicobacter* in Germany / N. Wueppenhorst, B. Hobmaier, M. Kist // *Helicobacter*. – 2009. – Vol. 14, № 4. – P. 349–354.
8. Resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole, tetracycline and amoxicillin / H. Wu [et al.] // *J Antimicrob. Chemother*. – 2000. – Vol. 46, № 1. – P. 121–123.
9. Молекулярно–генетическое тестирование мутаций гена 23S рРНК *H. pylori*, определяющих резистентность к кларитромицину / А.В. Воропаева [и др.] // *Медико-биологические проблемы жизнедеятельности*. – 2010. – № 4. – С.

30–35.

10. Megraud F. *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing / F. Megraud, P. Lehours // *Clinical microbiology reviews*. Apr. 2007. – Vol. 20, № 2. – P. 280–322.

11. Primary Levofloxacin Resistance and *gyr* A/B Mutations Among *Helicobacter pylori* in Japan / H. Miyachi [et al.] // *Helicobacter*. – 2010. – Vol. 11, № 4. – P. 243–249.

12. Chisholm, S. Frequency and molecular characteristics of ciprofloxacin – and rifampicin-resistant *Helicobacter pylori* from gastric infections in the UK / S. Chisholm, R. Owen // *J. Med. Microbiol.* – 2009. – № 58. – P. 1322–1328.

13. Страчунский, Л.С. Практическое руководство по антиинфекционной терапии / Л.С. Страчунский, Ю.Б. Белоусова, С.Н. Козлова // Смоленск, 2007. – С. 19–32

14. Antimicrobial Susceptibility of *Helicobacter pylori* determined by the E Test Using Tetrazolium Egg Yolk Agar / Valdez Y [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 1998. – Vol. 36, № 9. – P. 2784–2785.

15. Latham, S. Production of the RdxA protein in metronidazole– susceptible and – resistant isolates of *Helicobacter pylori* cultured from treated mice / S. Latham, A. Labigne, P. Jenks / *J. Antimicrob. Chemother.* – 2002. – № 49. – P. 675–678.

16. PCR–restriction fragment length polymorphism can also detect point mutation A2142C in the 23S rRNA gene, associated with *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin / A. Menard [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother.* – 2003. – № 46. – P. 1156–1157.

17. Nollau, P., Wagener C. Methods for detection of point mutations: performance and quality assessment / P. Nollau, C. Wagener // *Clin Chem.* – 1997. – Vol. 43, № 7. – P. 1114–1128.

18. Detection of Clarithromycin–Resistant *Helicobacter pylori* in Stool Samples / C. Fontana [et al.] // *Journal of Clinical Microbiology*. – 2003. – Vol. 41. – № 8. – P. 3636–3640.

19. PCR using 3'–mismatched primers to detect A2142C mutation in 23S

rRNA conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori* clinical isolates / T. Alarcon [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – № 38. – P. 923–925.

20. A PCR–oligonucleotide ligation assay to determine the prevalence of 23S rRNA gene mutations in clarithromycin–resistant *Helicobacter pylori* / G. Stone [et al.] // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1997. – № 41. – P. 712–714.

21. Real–time PCR assay for rapid and accurate detection of point mutations conferring resistance to clarithromycin in *Helicobacter pylori* / M. Oleastro [et al.] // *J. Clin. Microbiol.* – 2003. – № 41. – P. 397–402.

22. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent in situ hybridization / K. Trebesius [et al.] // *Gut.* – 2002. – № 46. – P. 608–614.

23. Mostafa, R. Pyrosequencing for discovery and analysis of DNA sequence variations / R. Mostafa, S. Shadi, G. Baback // *Pharmacogenomics.* – 2007. – Vol. 8, № 10. – P. 1437–1441.

24. Monstein, H. Rapid molecular identification and subtyping of *Helicobacter pylori* by pyrosequencing of the 16S rDNA variable V1 and V3 regions / H. Monstein, H. Nikpour-Badr, J. Jonasson // *FEMS. Microbiol. Lett.* – 2003. – № 199. – P. 103–107.

25. Trieber, C. Mutations in the 16S rRNA Genes of *Helicobacter pylori* Mediate Resistance to Tetracycline / C. Trieber, D. Taylor // *Journal of bacteriology.* – 2002. – № 4. – P. 2131–2140.

26. Glocker, E. Quinolone Resistance in *Helicobacter pylori* Isolates in Germany / E. Glocker, H. Stueger, K. Manfred // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 2007. – № 51. – P. 346–349.

27. Падутов, В.Е. Методы молекулярно-генетического анализа / В.Е. Падутов, О.Ю. Баранов, Е.В. Воропаев. – Минск: Юнипол, 2007. – 176 с.

