

РЕЗИСТЕНТНОСТЬ *HELICOBACTER PYLORI* К КЛАРИТРОМИЦИНУ В НОВОСИБИРСКЕ

Осипенко М.Ф., Бикбулатова Е.А., Шакалите Ю.Д., Чернова Л.Н., Устинов С.Н., Куликов И.В., Максимов В.Н.

Новосибирский государственный медицинский университет, МСЧ МВД, НИИ терапии СО РАМН

Осипенко Марина Федоровна
 E-mail: ngma@bk.ru

РЕЗЮМЕ

Эффективность эрадикационной терапии определяется несколькими факторами, один из которых — чувствительность *Helicobacter pylori* (*Hp*) к антибиотикам. Нами проведено исследование резистентности *Hp* к кларитромицину как препарату, входящему в схему эрадикации первой линии. Мутации *Hp* A2142G и A2143G были обнаружены в трех образцах слизистой оболочки желудка из 50 образцов *Hp*-позитивных пациентов. Таким образом, резистентность к кларитромицину составила 6%, что ниже среднероссийских показателей.

SUMMARY

Efficiency of eradication therapy is defined by several factors, one of which is sensitivity of *Hp* to antibiotics. We researched the resistance of *Helicobacter pylori* (*Hp*) to clarithromycin. The mutations of *Hp* (A2142G and A2143G) were found in three samples of gastric biopsy material from 50 *Hp*-positivity patients. Thus, resistance to clarithromycin is about 6% in Novosibirsk, so we can use the scheme of eradication with clarithromycin.

В последнее десятилетие наблюдается существенный прогресс в лечении заболеваний верхних отделов желудочно-кишечного тракта (ЖКТ), прежде всего за счет успешной эрадикации *Helicobacter pylori* (*Hp*). Эффективность эрадикационной терапии варьирует в различных регионах мира от 30 до 90% [1] и определяется рядом факторов, одним из которых является резистентность микроорганизма к антибактериальным препаратам. Согласно Маастрихтским рекомендациям I–IV, основными антибактериальными препаратами при лечении *Hp*-ассоциированных заболеваний являются: амоксициллин, кларитромицин, метронидазол, препараты висмута, тетрациклин [2]. Обязательным компонентом эрадикационной схемы первой линии является кларитромицин.

Кларитромицин — это 14-членный полусинтетический макролидный антибиотик, который благодаря липофильности легко проникает в слизистую оболочку желудка. Существует несколько механизмов формирования резистентности к кларитромицину [3,4]: модификация мишени (метилирование рибосом, мутации в рРНК, мутации в рибосомальных белках L4, L16, L22), активное выведение антибиотика из бактерии (эффлюкс-помпа), ферментативная инактивация.

Метилирование рибосом — самый распространенный механизм устойчивости к кларитромицину. Под действием белков-метилаз происходит диметилирование аденина в V домене 23S рРНК 50S-субъединицы рибосомы, в результате чего нарушается связывание макролидов с мишенью действия [5].

Современные методы определения чувствительности к антибиотикам подразделяются на методы серийных разведений (в агаре и бульоне, метод микроразведений), диффузионные (дискодиффузионный метод и метод E-тестов) и молекулярные методы [1; 4]. Молекулярно-генетические методы подразделяются на методы гибридизации с олигонуклеотидными зондами, методы анализа полиморфизма длины рестрикционных фрагментов продуктов полимеразной цепной реакции (ПЦР-ПДРФ) и методы ПЦР в реальном времени. Наиболее часто применяются тесты, основанные на амплификации 23S рРНК или гибридизации (FISH-анализ) [1; 5].

В целом доля *H. pylori*, резистентного к терапии кларитромицином, увеличивается, что делает целесообразным и необходимым проведение анализа чувствительности к антибиотикам *H. pylori* в регионе [3].

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Методом случайной выборки было обследовано 50 больных с *Hp*-ассоциированными заболеваниями, направленных на ФГДС с синдромом диспепсии врачами поликлиники в МСЧ МВД России. Из них 34 (68%) мужчин и 16 (32%) женщин. Хронический антральный гастрит был выявлен у 31 (62%) больного, язвенная болезнь желудка или двенадцатиперстной кишки — у 19 (38%). У 39 (78%) обследованных эрадикация *Hp* ранее не проводилась, у 11 (22%) ранее проведенная эрадикация первой линии на основе кларитромицина и амоксицилина была неэффективна. Наличие возбудителя *Hp* было подтверждено с помощью световой микроскопии, непосредственно после забора материала (биоптат слизистой оболочки желудка и цитологическое исследование). Для исследования резистентности биоптаты были заморожены и хранились при температуре -20° в 0,9%-ном физиологическом растворе.

Экстракция ДНК проводилась методом фенол-хлороформной экстракции. Детекцию мутаций A2142G и A2143G в гене 23S рРНК микроорганизма проводили методом анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (RFLP). Для проведения полимеразной цепной реакции использовали следующие праймеры: прямой праймер: 5'-AGGTTAAGAGGATGCGTCAGTC-3' и обратный праймер 5'-CGCATGATATTTCCCATTAGCAGT-3' [6].

Смесь для ПЦР объемом 25 мкл включала: 100 нг ДНК, 1 ЧPCR буфер, 0,2 мол/л каждого праймера, 0,2 ммол/л каждого dNTP, 1,5 ммол/л $MgCl_2$ и 1 ед. Таг полимеразы. Амплификация проводилась в следующем температурном режиме: $95^{\circ} C/50$ с, $63^{\circ} C/50$ сек, $72^{\circ} C/50$ с — 33 цикла.

Визуализация продукта ПЦР длиной 267 последовательностей нуклеотидов (п. н.) проводилась в 4%-ном полиакриламидном геле с последующей окраской бромистым этидием. Для определения мутации A2142G использовали рестриктазу BstVI, для определения мутации A2143G использовали фермент Bso 31I. Рестрикция проводилась согласно протоколу фирмы изготовителя («Сибэнзим»). Продукты рестрикции идентифицировали в 6%-ном полиакриламидном геле. В случае мутации A2142G определялись продукты длиной 24 и 243 п. н., для мутации A2143G определялись продукты рестрикции длиной 33 и 234 п. н.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Согласно приводимой методике было проанализировано 50 биоптатов. Мутация A2142G была обнаружена в одном образце, мутации A2143G были обнаружены в двух образцах (рис. 1).

Все резистентные к кларитромицину штаммы *Hp* были выявлены у первичных больных, ранее не получавших эрадикационную терапию (рис. 2).

Среди 11 пациентов, у которых проводимая ранее эрадикация *Hp* была неэффективна, резистентные штаммы не выявлены, следовательно, причина неудачи связана с другими факторами, наиболее распространенный из которых — это низкий комплайнс [7].

ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Выявленные в исследовании мутации A2143G и A2142G наряду с A2142C относятся к самым распространенным мутациям *Hp*. В большинстве случаев *Hp* содержит два 23S рРНК гена и мутации обнаруживаются в обеих копиях [1; 8]. Применение метронидазола в схемах эрадикации ограничено вследствие высокой резистентности к нему *H. pylori*, средний уровень ее по России составляет 55% [9]. Устойчивость *H. pylori* к амоксициллину в отличие от метронидазола крайне низкая. В большинстве стран устойчивые штаммы не встречаются или их доля не превышает 1% [8].

С учетом редкого использованием метронидазола при эрадикации и низкой резистентности *Hp* к амоксициллину в значительной степени прогноз эрадикационной терапии определяется чувствительностью микроорганизма к кларитромицину как препарату, входящему в состав схем первой линии терапии хеликобактериоза [9]. Согласно 3-му Маастрихтскому соглашению, использование кларитромицина имеет смысл только в том случае, если первичная устойчивость к этому антибиотику составляет менее 15–20%.

Распространенность кларитромицин-резистентных штаммов *H. pylori* в значительной степени варьирует между странами и регионами. По данным проспективного многоцентрового исследования в 22 центрах 17 стран Европы уровень устойчивости *H. pylori* к кларитромицину составил в среднем 9,9% [10]. В 2005 году процент резистентных к кларитромицину штаммов в Москве составил 19,3% [10]. В 2010 году в Москве точечные мутации в позиции A2143G гена 23S рРНК *H. pylori*, ассоциированные с резистентностью к кларитромицину, выявлены у 14,5% больных [11].

ВЫВОДЫ

Таким образом, резистентность к кларитромицину в Новосибирске, по нашим данным, составила 6%, что ниже среднероссийских показателей. При этом резистентные штаммы не выявлены ни у одного пациента, получавшего ранее эрадикационную терапию на основе кларитромицина. Все сказанное выше делает предпочтительным применение в Новосибирске схем лечения *Hp* на основе кларитромицина с достаточно высоким ожидаемым эффектом от эрадикационной терапии. Методы молекулярно-генетического анализа позволят в дальнейшем выявлять резистентные штаммы, определять динамику их распространенности и прогнозировать эффективность эрадикационной терапии.

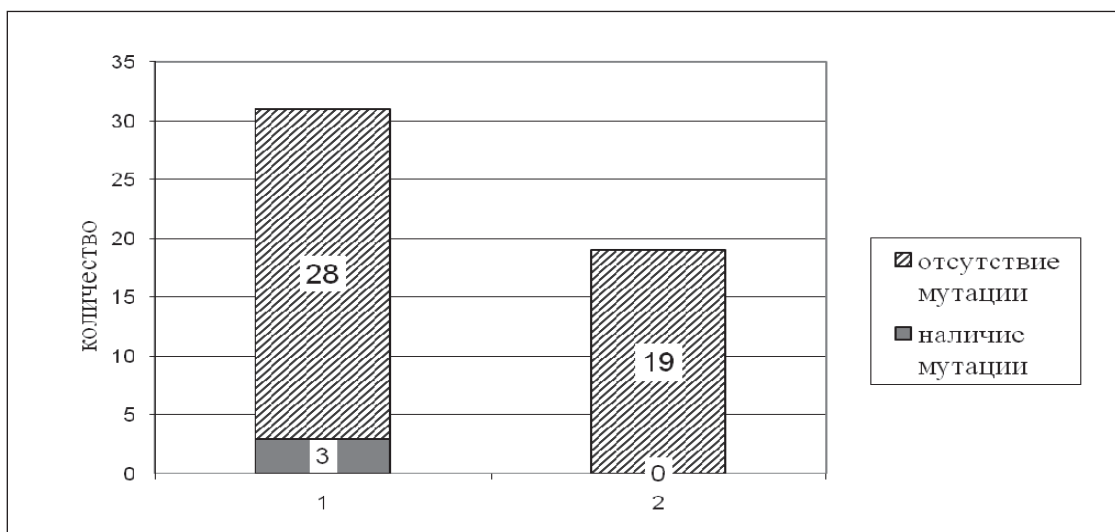


Рис. 1. Наличие мутации A 2142G и A 2143G у пациентов с хроническим гастритом (1) и язвенной болезнью (2).

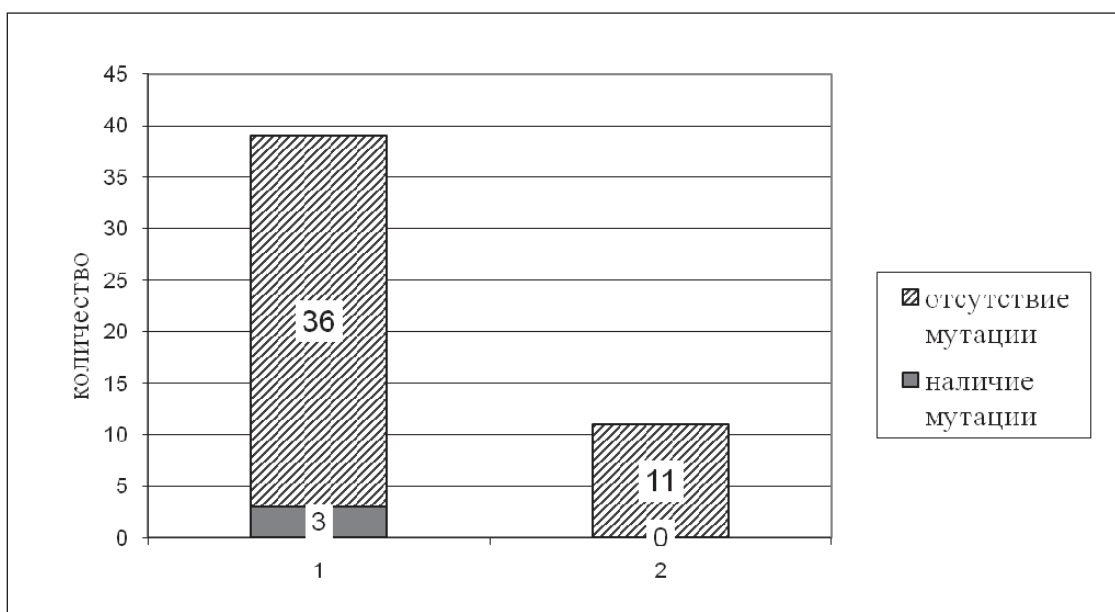


Рис. 2. Наличие мутаций Hsp к кларитромицину у первичных пациентов (1) и получавших эрадикационную терапию ранее (2).

ЛИТЕРАТУРА

1. Саблин О.А., Ильчишина Т.А. Проблема резистентности *Helicobacter pylori* к кларитромицину // Consilium medicum. Гастроэнтерология. — 2009. — № 3. — С. 4–8.
2. Malfertheiner P., Megraud F., OrMorgan C. et al. Current concept in the management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht III Consensus report // Gut. — 2007. — V.56.
3. Рачина С.А., Страчунский Л.С., Козлов Р.С. Кларитромицин: есть ли потенциал для клинического использования в XXI веке // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. — 2005. — № 7 (4). — С. 369–392.
4. Lee J., Shin J., Roe I. et al. Impact of clarithromycin resistance on eradication of *Helicobacter pylori* in infected adults // Antimicrob. Agents Chemother. — 2005. — № 4. — P. 1600–1603.
5. Стецюк О.У., Андреева И.В. О селекции устойчивости к макролидам // Клини. микробиол. антимикроб. химиотер. — 2010. — № 12 (3). — С. 255–259.
6. Megraud F., Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing // Clin. Microbiol. Rev. — 2007. — Vol. 20. — P. 280–322.
7. Осипенко М.Ф., Бикбулатова Е.А., Константинов В.И. Комплайс: определяющие факторы и пути оптимизации приверженности к лечению // Сиб. мед. обозрение: ежекв. мед. журн. — 2010. — N 5. — С. 94–97.
8. Megraud F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing // Gut. — 2004. — № 53. — P. 1374–1384.
9. Glupczynski Y., Megraud F., Lopez-Brea M. et al. European multicenter survey of in vitro antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori* // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. — 2000. — Vol. 11. — P. 820–823.
10. Лапина Т.Л. Выбор схемы эрадикационной терапии при *Helicobacter pylori* в случае необходимости повторного лечения // Врач. — 2008. — № 4. — С. 64–67.
11. Belousova N.L., Lazebnik L.B., Bordin D.S., Miheeva O.M. Moscow study of frequency of site-specific mutations in the 23S rRNA gene of *Helicobacter pylori*: preliminary data // Turkish J. Gastroenterol. — 2011. — Vol. 22, suppl. 1. — P. 23.