

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ *HELICOBACTER PYLORI* К КЛАРИТРОМИЦИНУ У ЖИТЕЛЕЙ САНКТ-ПЕТЕРБУРГА С ЯЗВЕННОЙ БОЛЕЗНЬЮ

Барышников Н. В.¹, Денисова Е. В.⁶, Корниенко Е. А.², Лобач С. М.⁴, Лоева И. А.¹, Паролова Н. И.², Рыжих В. А.⁵, Солоницин Е. Г.⁷, Смирнова А. С., Старостин Б. Д.⁸, Суворов А. Н.³, Суворова М. А.⁹, Е. И. Ткаченко¹, Успенский Ю. П.¹

¹ Санкт-Петербургская государственная медицинская академия имени И. И. Мечникова

² Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия

³ Научно-исследовательский институт экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

⁴ Медсанчасть № 122, Санкт-Петербург

⁵ Медицинский центр «Адмиралтейские верфи», Санкт-Петербург

⁶ Медицинский центр «Медэкспресс», Санкт-Петербург

⁷ Городская больница № 25, Санкт-Петербург

⁸ МГЭЦ № 1, Санкт-Петербург

⁹ Научно-исследовательская лаборатория «Диагностика», Санкт-Петербург

ВВЕДЕНИЕ

В многочисленных исследованиях было доказана связь *Helicobacter pylori* с развитием острого и хронического гастрита, язвенной болезни двенадцатиперстной кишки и желудка, новообразований желудка (аденокарцинома, мальтома). Треть населения планеты инфицирована *H. pylori*. Эта «медленно действующая терапевтическая инфекция», согласно теории терапевтических инфекций Е. И. Ткаченко [5], наиболее распространена в мире [6]. Существуют также патологические состояния, связь с которыми в отношении *H. pylori* остается сомнительной.

Эрадикация *H. pylori* коренным образом меняет характер течения язвенной болезни, предупреждая развитие рецидивов и повторных кровотечений, способствует более быстрому рубцеванию язвенного дефекта и наступлению гистологической ремиссии при хроническом гастрите, уменьшает выраженность атрофии слизистой желудка, способствует регрессии мальтомы желудка на ранних стадиях, предупреждает развитие рака желудка. Современные международные рекомендации предусматривают проведение комплексной эрадикационной антихеликобактерной терапии, которая включает ингибитор протонной помпы (ИПП) совместно с двумя или тремя антибиотиками. Необходимо, чтобы пороговые значения успешной эрадикации *H. pylori* достигали 80–90 %,

но эффективность лечения значительно снижается при персистенции штаммов микроорганизма, устойчивых к используемым антибиотикам. Это особенно актуально для препаратов группы макролидов, прежде всего кларитромицина, который, согласно Маастрихтскому соглашению третьего пересмотра, применяется в схемах антихеликобактерной терапии 1-й линии. В связи с тем что схемы на основе метронидазола в настоящее время используются крайне ограниченно (районов с резистентностью *H. pylori* к метронидазолу менее 40 % в Европе практически не осталось), неудачи эрадикационной терапии связывают в основном с возрастающей резистентностью микроорганизма именно к кларитромицину. Механизм устойчивости к кларитромицину у штаммов *H. pylori* связан с уменьшением эффективности связывания макролидов с рибосомой, что наиболее часто обусловлено возникновением точечных мутаций в пределах участка 23S рибосомной РНК (рРНК), отвечающего за пептидилтрансферазную активность. Метаанализ, включавший 53000 пациентов, показал, что уровень успешной эрадикации *H. pylori* после назначения стандартной терапии составляет менее 80 % [7]. По некоторым данным, при условии персистенции резистентных к антибиотикам штаммов *H. pylori* эффективность эрадикационной терапии



может снижаться до 50 % при использовании терапии первой линии (ИПП + 2 антибиотика).

В России на рубеже XX — XXI веков эпидемиологические исследования по оценке резистентности к компонентам эрадикационной терапии выполняла Л. В. Кудрявцева. Согласно полученным ею данным, уровень резистентности *H. pylori* к кларитромицину в данный период не достигал 20 % [2; 3].

Большинство мутаций устойчивости представляют собой нуклеотидные замены аденина на гуанин в положении 2142 и 2143 и тимина на цитозин в положении 2717. Эти замены приводят также к образованию сайтов рестрикции для эндонуклеаз *MboII*, *BsaI* и *HhaI* соответственно. Использование метода полимеразной цепной реакции (ПЦР) в сочетании с рестрикционным анализом (ПДРФ) позволяет эффективно выявлять точечные мутации в гене 23S рРНК и может служить надежным инструментом определения устойчивых к кларитромицину штаммов [8].

Цель работы — определить частоту встречаемости штаммов *H. pylori* с генетически детерминированной устойчивостью к действию кларитромицина у больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки (ЯБДК) в Санкт-Петербурге.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

С целью оценки резистентности *H. pylori* к кларитромицину было обследовано 150 больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки из пяти гастроэнтерологических центров различных районов Санкт-Петербурга (Красногвардейского, Невского, Центрального, Адмиралтейского, Выборгского): по 30 больных из каждого района. Таким образом, способ организации выборки носил характер стратифицированного (районированного) отбора, когда из каждого слоя пациентов, проживающих в данном районе (страта), извлекалась простая случайная выборка установленного объема. Случайность отбора гарантировалась тем, что в искомую выборку были включены все больные язвенной болезнью, произвольно самостоятельно обратившиеся в определенный территориальный центр для получения гастроэнтерологической помощи. Регулярность отбора обеспечивалась идентичными сроками отбора пациентов во всех исследовательских центрах. С целью придания выборке клинической однородности она была рандомизирована по возрасту (в исследование не включались лица моложе 18 и старше 70 лет), язвенному анамнезу (включались пациенты с ранее подтвержденным хотя бы однократно диагнозом язвенной болезни). Решающим критерием преодоления квазиэкспериментальных эффектов, связанных с приобретенной резистентностью к кларитромицину вследствие неэффективной эрадикации, явилось включение только тех больных, у которых отсутствовали анамнестические

указания на проведение эрадикационной терапии с использованием кларитромицина по поводу язвенной болезни, а равно указания на использование кларитромицина по поводу других заболеваний за последние два года. Данный способ организации выборки позволил придать ей репрезентативный характер и возможность экстраполяции полученных результатов на всю генеральную совокупность больных язвенной болезнью в мегаполисе Санкт-Петербурга.

Анализ биоптатов проводился в научно-исследовательской лаборатории «Диагностика» в Санкт-Петербурге. Для проведения анализа в предварительно полученных биоптатах слизистой оболочки антрального отдела желудка был обнаружен *H. pylori*, ДНК которого была выделена из собранного биопсийного материала с помощью набора для выделения ДНК «ДНК-сорб А» («АмплиСенс», Россия) согласно инструкциям производителя.

Выделенные пробы ДНК анализировались на наличие мутаций устойчивости к кларитромицину. Для этого была использована «полугнездовая» ПЦР. ПЦР была выполнена в буфере, содержащем 67 мМ Трис-НCl (pH 8,3), 17 мМ $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 2,5 мМ MgCl_2 , 0,1 %-ный Tween-20, 0,12 мкг БСА, 8 %-ного глицерола с 200 мкМ каждого дезокситрифосфата, 15 пмоль каждого праймера и 2,5 U Taq ДНК-полимеразы («Хеликон», Россия). Первичная ПЦР проводилась в объеме 25 мкл с праймерами:

Hp1 (CCACAGCGATGTGGTCTCAG) и

Hp2 (TGTGTAGCTACCCAGCGATGCTC).

В качестве матрицы использовали 5 мкл выделенного образца ДНК. Амплификация была выполнена в PTC-150 MiniCycler™ (MJ Research, США) по программе: первичная денатурация при 94 °C 2 минуты, последующая амплификация в течение 30 циклов при 94 °C 30 секунд, 60 °C 30 секунд, 72 °C 40 секунд и стадия постсинтеза 72 °C 10 минут. Вторичная ПЦР была выполнена с праймерами

Hp4 (GTCGGTTAAATACCGACCTG) и

Hp2 (TGTGTAGCTACCCAGCGATGCTC)

в объеме 50 мкл, где в качестве матрицы использовали 2 мкл амплификата из первичной ПЦР. Реакцию проводили при тех же условиях.

Анализ продуктов ПЦР проводили с помощью гель-электрофореза в 1,5 %-ном агарозном геле с бромистым этидием в буфере ТАЕ. Продукт первичной амплификации имел размер 992 пн, вторичной — 782 пн.

Рестрикционный анализ продуктов вторичной ПЦР проводили в 20 мкл конечного объема с 10 мкл ПЦР-продукта и 5 U каждой рестриктазы *MboII*, *Bso3II*, *AspLEI* («СибЭнзим», Россия) в соответствующем буфере согласно инструкциям производителя. Последние два фермента являются изоизомерами *BsaI* и *HhaI* соответственно. Детекцию рестрикционных фрагментов проводили в 1,5 %-ном агарозном геле с бромистым этидием в буфере ТАЕ.

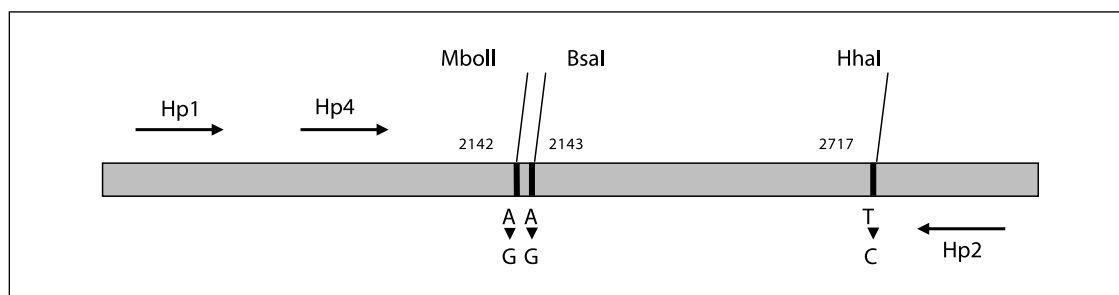


Рис. 1. Расположение праймеров, сайтов мутации и рестрикции на фрагменте гена 23S рРНК. Цифры обозначают положение нуклеотида

Таблица 1

РАЗМЕР РЕСТРИКЦИОННЫХ ФРАГМЕНТОВ ПРИ НАЛИЧИИ И ОТСУТСТВИИ МУТАЦИЙ В ГЕНЕ 23S РРНК			
Эндонуклеаза рестрикции	Выявляемая мутация	Нет мутации	Есть мутация
MboII	A2142G	782	669, 113
BsaI	A2143G	782	668, 114
HhaI	T2717C	614, 168	514, 168, 100

Пробы ДНК от пациентов были использованы для двухраундовой «полугнездовой» ПЦР с праймерами, амплифицирующими участок гена 23S рРНК, в котором возникали точечные мутации, приводящие к устойчивости *H. pylori* к кларитромицину (рис. 1). Применение «полугнездовой» ПЦР позволяет увеличить чувствительность и специфичность анализа.

Нуклеотидные замены аденина на гуанин в положении 2142 приводят к возникновению сайта рестрикции *MboII*, в положении 2143 — *BsaI*. Замена тимина на цитозин в положении 2717 ведет к появлению дополнительного сайта *HhaI*. Таким образом, используя эти ферменты при рестрикции продукта вторичной ПЦР можно определить, имеются ли указанные мутации в гене 23S рРНК (табл. 1).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Установлено, что гены, кодирующие устойчивость *H. pylori* к кларитромицину, а как следствие, возможно, ко всем макролидам, выявляются у 40 % пациентов (рис. 2).

В табл. 2 представлено распределение мутаций у пациентов, инфицированных *H. pylori*, с точечными мутациями, связанными с формированием устойчивости к кларитромицину.

Если допустить, руководствуясь полученными данными, что вся совокупность больных язвенной болезнью в Санкт-Петербурге, которая насчитывает, по данным городской гастроэнтерологической службы, 38500 человек, на 40 % состоит из лиц,

имеющих резистентность к кларитромицину, и соответственно на 60 % — с ее отсутствием, то в проанализированной нами выборке из 150 человек пропорции лиц с наличием и отсутствием резистентности будут примерно такие же. Возможны случайные отклонения от точных пропорций, но они будут невелики. Величину отклонений можно вычислить по следующей формуле:

$$\Delta = \pm 1,96 \sqrt{1 - \frac{n}{N}} \sqrt{\frac{p(1-p)}{n-1}} \quad (1)$$

Кроме числа людей, в выборке n и в совокупности N в формулу входит еще доля p 0,40 лиц, имеющих резистентность к кларитромицину. Число 1,96 соответствует принятому в медицинских исследованиях уровню доверия 95 %. Чтобы вычислить

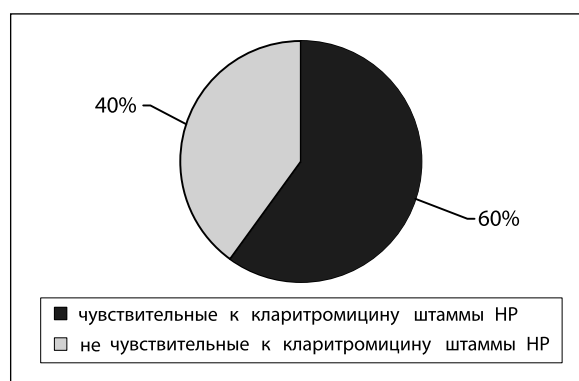


Рис. 2. Устойчивость *Helicobacter pylori* к действию кларитромицина у больных ЯБДК по данным эпидемиологического исследования в Санкт-Петербурге

Таблица 2

РЕЗУЛЬТАТЫ РЕСТРИКЦИОННОГО АНАЛИЗА <i>H. PYLORI</i> НА УСТОЙЧИВОСТЬ К КЛАРИТРОМИЦИНУ	
Выявляемая мутация	% встречаемости среди всех выявленных мутаций
A2143G	66
A2142G	17
T2717C	17

возможные случайные отклонения для доли лиц, имеющих резистентность к кларитромицину, в выборке (1) после подставления в формулу числовых значений параметров и проведения расчетов получилось, что доля лиц с резистентностью к кларитромицину в генеральной совокупности может случайно отклоняться от правильного значения 0,40 в пределах $\pm 0,079$, то есть на $\pm 7,9\%$ (величина Δ , или статистическая погрешность). Иными словами, доля больных с резистентностью в выборке может колебаться в интервале от $40\% - 7,9\% = 32,1\%$ до $40\% + 7,9\% = 47,9\%$ (доверительный интервал с уровнем доверия 95 %).

Полученные нами результаты резистентности к кларитромицину среди взрослых больных практически полностью согласуются с результа-

тами исследований оценки резистентности к кларитромицину у хеликобактерпозитивных детей в Санкт-Петербурге, которая ранее была выполнена научной группой под руководством профессора Е. А. Корниенко [1].

ВЫВОДЫ

Полученные данные определяют необходимость дифференцированного подхода к назначению антибиотиков в схемах антихеликобактерной терапии и оптимизации способов как первичного обследования пациентов, так и антихеликобактерной терапии, поскольку столь низкий уровень эрадикации ограничивает применение стандартных схем и делает их использование неоправданным с клинических позиций. Одним из наиболее обоснованных способов преодоления резистентности в этих условиях является отказ от использования кларитромицина и широкое использование схем эрадикации, содержащих соли висмута (де-нол), к которому отсутствует врожденная и не развивается приобретенная резистентность. Признание данного факта нашло отражение в рекомендациях по проведению эрадикационной терапии Научного общества гастроэнтерологов России под руководством президента НОГР Л. Б. Лазебника в рамках выработки Московских соглашений по диагностике и лечению кислотозависимых заболеваний органов пищеварения [4].

ЛИТЕРАТУРА

1. Корниенко Е. А., Паролова Н. И. Проблема антибиотикорезистентности *Helicobacter pylori* у детей и выбор терапии//Вопр. соврем. педиатрии. — 2006. — Т. 5, № 5, — С. 1–4.
2. Кудрявцева Л. В. Опыт изучения антибиотикорезистентных российских штаммов *Helicobacter pylori*//Мат. 7-й сессии Рос. группы по изучению *Helicobacter pylori*, 27–28 мая 1998, Нижний Новгород. С. 11–14.
3. Кудрявцева Л. В., Исаков В. А., Иваников И. О. и др. Резистентность *Helicobacter pylori* к метронидазолу, кларитромицину и амоксицилину в Москве, Санкт-Петербурге и Абакане в 2001 г.//Педиатрия. — 2002. — № 2 (приложение). — С. 61–63.
4. Стандарты. Диагностика и терапия кислотозависимых заболеваний, в том числе ассоциируемых с *Helicobacter pylori* (Третье Московское соглашение)//Эксперим. и клин. гастроэнтерол. — 2005. — № 5. — С. 4.
5. Ткаченко Е. И., Успенский Ю. П. Питание, микробиоценоз и интеллект человека. — СПб.: СпецЛит, 2006. — 590 с.
6. Cover T. L., Blaser M. J. *Helicobacter pylori* infection, a paradigm for chronic mucosal inflammation: pathogenesis and implications for eradication and prevention//Advances in Int. Med. — 1996. — Vol. 41. — P. 85–117.
7. Laheij R. J. et al. Evaluation of treatment regimens to cure *Helicobacter pylori* infection — A meta-analysis//Aliment. Pharmacol. Therap. — 1999. — Vol. 13. — P. 857–864.
8. Megraud F. *Helicobacter pylori* and macrolides//Macrolide antibiotics/Schonfeld W., Kirst H. A. (eds.). — Berlin: Berkhauer Verlag, 2002. — P. 243–260.