

# ОПРЕДЕЛЕНИЕ РЕЗИСТЕНТНОСТИ *HELICOBACTER PYLORI* К КЛАРИТРОМИЦИНУ И ЛЕВОФЛОКСАЦИНУ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МУЛЬТИПЛЕКСНОЙ ПОЛИМЕРАЗНОЙ ЦЕПНОЙ РЕАКЦИИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Воропаева А.В., к.б.н., доцент

Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека

## Актуальность

Неуспешность эрадикационной терапии вызвана главным образом прогрессирующей устойчивостью к антибиотикам среди *H. pylori*. Согласно полученным нами данным, в Республике Беларусь распространенность *H. pylori*, первично устойчивых к метронидазолу составляет 48,8 %, к кларитромицину 10,5% и продолжает расти, достигая при неудачной терапии первой линии 29,2%. Применение левофлоксацина для эрадикационной терапии привело к появлению резистентности у 12,9 % *H. pylori* (Воропаева А.В., 2021).

Таким образом, возникает необходимость в определении чувствительности *H. pylori* к данным антибиотикам до эрадикационного лечения и для скрининговых исследований в регионе [1].

## Цель

Разработать и оптимизировать параметры мультиплексной полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР РВ) для одновременного выявления резистентности к кларитромицину, включая точечные мутации гена 23S рРНК (A2143G, A2142G, A2143G) и к левофлоксацину, включая мутации гена *gyrA*, присутствия в образце *H. pylori* и гена  $\beta$ -актина человека как внутреннего контрольного образца.

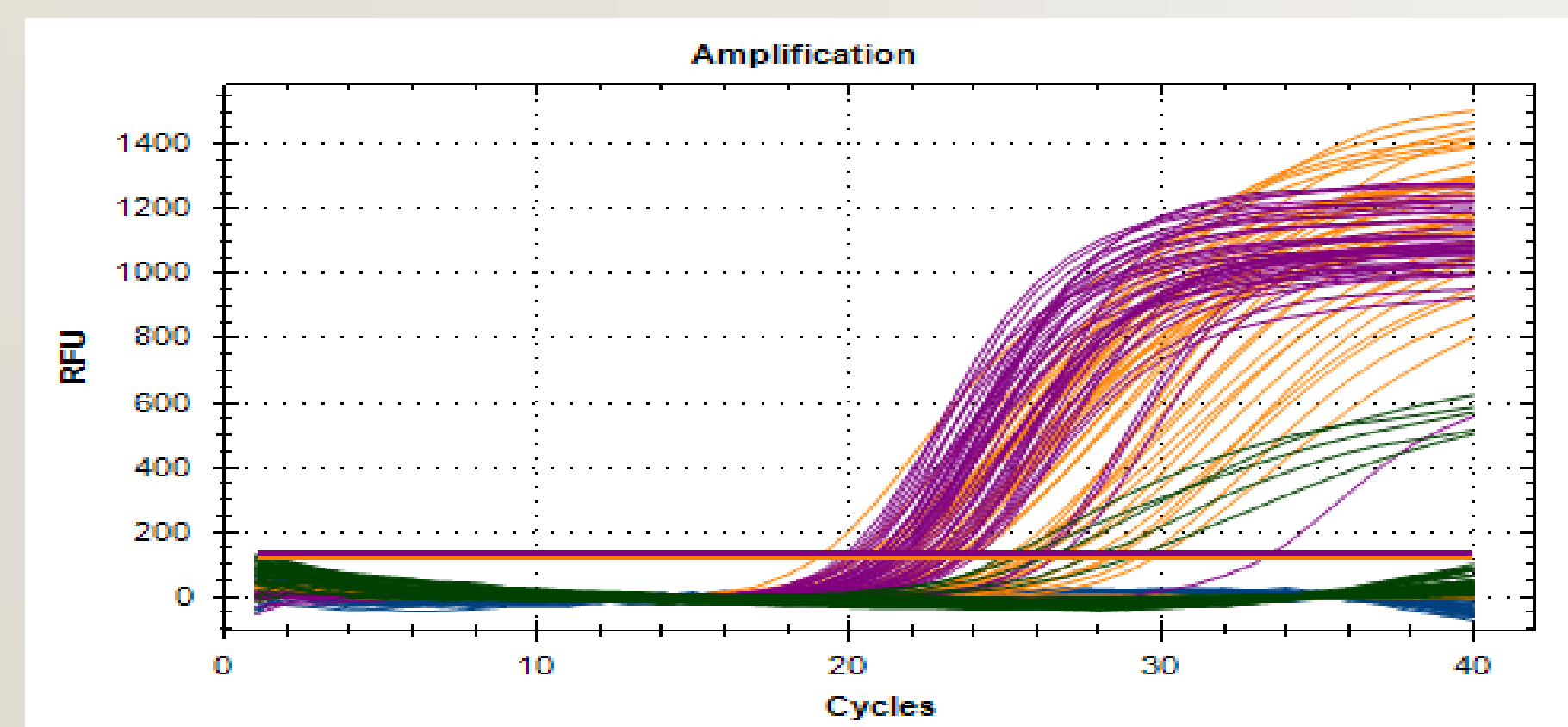


Рис 1. Кинетические кривые определения резистентности *H. pylori* к левофлоксацину и кларитромицину

— 23 s RNA — *gyr A*  
—  $\beta$ -актин — 16s RNA

## Материалы и методы

Отработку методики проводили для каждого параметра и в целом для мультиплексной ПЦР РВ при анализе 86 образцов ДНК пациентов с гастродуоденальными заболеваниями и 8 заведомо положительных образцов (2 – резистентны к кларитромицину, 2 – к левофлоксацину, 2 – присутствует *H. pylori*, 2 – отсутствует *H. pylori* и присутствует  $\beta$  – актин).

Дополнительно использовали ОКО – 1 отрицательный образец (дистиллированная вода), предназначенный для выявления артефактов в ходе реакции и постановку NTC (холостой пробы).

Для проведения мультиплексной ПЦР РВ использовали следующие праймеры и флуоресцентные зонды, синтезированные по нашему заказу ООО«АртБиоТех», Республика Беларусь.

### 16S rRNA

HP F5'-CCCATCAGGAAACATCGCTTCA 3'  
HP-R 5'-TCCACTATGCTGGAGAATTGGCTA 3'  
HP-P-ROXTGCTTGCCACGCCATCCATCACATCA 5'ROX, 3'BHQ1

### *gyrA*

259F5'CACCCCATGGCGGTT 3'  
261G F 5'CCCATGGCGATACG3  
261A-F 5'CCCATGGCGATACA3'  
271A-F 5'CATGGCGATAATGCGGTTTGTAT3'  
271T-F5'CATGGCGATAATGCGGTTTGTAT3'  
272G-F 5'ACCCCATGGCGATAATGCGGTTTATCG 3'  
HP-F-R 5'ACTCGCCTTAGTCATTTC3'  
HP-F-P HEX CGTTATCGCCATCAATAGAGCCAA 5'HEX, 3'BHQ2

### 23S rRNA

2142C F 5'TCCTACCCGCGGCAAGACTGC 3'  
2142G F 5'TTCCTCCTACCCGCGGCAAGACAGG 3'  
2143G F 5'CCTACCCGCGGCAAGACGACG 3'  
HP C R 5'GGATGACTCCATAAGAGCCAAAGC 3'  
HP C P FAM CGTCTTGCCGCGGGTAGGAGGAATTTTCAC 5'FAM, 3'BHQ1

### Internal control

$\beta$ -ACTIN F5' CCCATCTACGAGGGCTACGC3'  
 $\beta$ - ACTIN R5'GGATCTTCATGAGGTAGTCGGTCAG3'  
 $\beta$ - ACTIN P CY5  
CCATCCTGCGTCTGGACCTGGCTGGC5'CY5,3'BHQ2.

## Результаты и их обсуждение

Полученные результаты интерпретировали следующим образом:

Наличие характерной кривой по каналу детекции CY5 – выявлен фрагмент гена  $\beta$ -актина (ВКО)–образец подлежит дальнейшему анализу;

Наличие характерной кривой по каналу детекции ROX – выявлена ДНК *H.pylori*;

Наличие характерной кривой по каналу детекции HEX – выявлена резистентность к левофлоксацину;

Наличие характерной кривой по каналу детекции FAM – выявлена резистентность к кларитромицину.

Наличие характерных кривых даже по одному из детектируемых каналов (FAM, HEX, ROX, CY5) в образцах ОКО и NTC свидетельствует о загрязнении реакционной смеси или расходных материалов (ложноположительные образцы). Отсутствие характерного роста кривой по каналу CY5 (ВКО) свидетельствует о ингибировании ПЦР или недостаточном количестве биологического материала (ложноотрицательные образцы).

**Статистический анализ.** Результаты представлены в виде частоты резистентности к конкретному гену (в процентах).

При анализе кривых флуоресценции 4 образца ДНК отрицательны по гену  $\beta$ -актин и не учитывались при дальнейшем анализе (Ср, Cy5 16,8 - 30,1).

ДНК 16s RNA *H.pylori* (Ср, Rox 15,5-30,1), свидетельствующая о инфицировании бактерией, выявлена в 50 % (41 из 82).

Резистентность к кларитромицину не выявлена, резистентность к левофлоксацину (Ср, Hex 23,6 -30,8) составила 7,3 % (3 из 41).

Заведомо положительные пробы имели характерный рост кривых по соответствующим каналам детекции, в заведомо отрицательных рост кривых не отмечен.

## Заключение

В результате исследования подобраны параметры мультиплексной ПЦР РВ для одновременного обнаружения непосредственно *H. pylori* и резистентности к основным лекарственным средствам для эрадикации (кларитромицину и левофлоксацину).

Применение данной методики в клинической практике предполагает быстрый лабораторно подтвержденный ответ об имеющейся у пациента чувствительности к антибиотикам и соответствующему назначению индивидуализированной эрадикационной терапии *H. pylori*.