

УДК 616.36-092:579.835.12

## Резистентность *H. pylori* к антибактериальным препаратам и методы ее определения

Г.Ш. Исаева

Кафедра микробиологии Казанского государственного медицинского университета, Казань, Россия

Во всем мире, в том числе в нашей стране, отмечена тенденция к распространению первичной, вторичной и множественной устойчивости *H. pylori* к антибактериальным препаратам, что значительно снижает эффективность противохеликобактерной терапии. Выявлены существенные различия в уровнях антибиотикорезистентности *H. pylori* в различных регионах России, что указывает на назревшую необходимость проведения многоцентровых исследований. Широкое внедрение молекулярно-генетических методов исследований в практических лабораториях позволит выявлять циркуляцию резистентных штаммов и динамику их распространения, оценивать

результаты эрадикационной терапии и, возможно, в будущем определять группы больных с определенными генотипами, определяющими резистентность к стандартным схемам противохеликобактерной терапии. В статье представлен обзор современных представлений о распространении антибиотикорезистентности *Helicobacter pylori*, ее механизмах и методах определения чувствительности этого микроорганизма к антибактериальным препаратам.

**Ключевые слова:** *H. pylori*, антибиотикорезистентность, механизмы, эффлюкс, определение чувствительности.

### Antimicrobial Resistance of *H. pylori* and Susceptibility Determination Methods

G.Sh. Isaeva

Department of Microbiology, Kazan State Medical University, Kazan, Russia

At present, primary, secondary, and multiple resistance of *H. pylori* to antimicrobial agents tends to increase, which significantly affects efficacy of eradication therapy. There were found significant differences in antimicrobial resistance of *H. pylori* between Russian regions, which indicate a need for multicenter epidemiological studies. A common use of molecular methods in clinical laboratory practice would allow detection of resistant strains and their

prevalence changes, assessment of *H. pylori* eradication therapy outcomes and, possibly, identification of patient populations with specific genotypes conferring resistance to standard regimens for eradication. This paper provides a review of currently available data on antimicrobial resistance of *H. pylori* and its mechanisms as well as susceptibility determination methods for this pathogen.

**Key words:** *H. pylori*, antimicrobial resistance, mechanisms, efflux, susceptibility determination.

---

Контактный адрес:  
Гузель Шавхатовна Исаева  
Эл. почта: guisaeva@rambler.ru

Открытие в 1984 году роли бактерии *Helicobacter pylori* в развитии хронического гастрита перевернуло представления об этиологии ряда болезней желудочно-кишечного тракта. Это дало мощный импульс для дальнейших исследований в различных областях медицины: микробиологии, гастроэнтерологии, иммунологии, генетики, эпидемиологии, фармакологии. В настоящее время доказано, что в результате использования эрадикационной терапии снижается риск язвенных кровотечений, развития онкологических заболеваний желудка (аденокарциномы, MALT-лимфомы). Но наряду с успехами антибактериальной терапии *H. pylori*-инфекции в мире отмечена тенденция к распространению штаммов *H. pylori*, резистентных ко многим препаратам, используемым в схемах лечения.

### Антибиотикорезистентность *H. pylori*

При изучении антибактериального действия различных антимикробных препаратов было выявлено, что клинические изоляты *H. pylori* чувствительны ко многим  $\beta$ -лактамам, фосфомицину, макролидам, аминогликозидам, тетрациклинам, хлорамфениколу, рифамицинам, фторхинолонам, нитроимидазолам и нитрофуранам [1]. Все выше-названные антимикробные препараты применялись с целью эрадикации *H. pylori*, за исключением хлорамфеникола (из-за высокой токсичности) и аминогликозидов (в связи с отсутствием активности транспорта в микроаэрофильных условиях). Соли висмута и ингибиторы протонной помпы также обладают противохеликобактерной активностью при условии создания высоких концентраций, что не выполнимо *in vivo*. Рекомендованные схемы для эрадикации *H. pylori* включают два антимикробных препарата и один антисекреторный препарат, преимущественно ингибитор протонной помпы, к которым могут быть добавлены соли висмута [2].

Однако в последние годы при проведении эрадикационной терапии одной из существенных проблем, влияющих на результат лечения, стала резистентность *H. pylori* к антибактериальным препаратам. Известно, что устойчивость микроорганизмов к химиотерапевтическим препаратам может быть природной (видовой), обусловленной отсутствием мишени для действия антибиотика, и приобретенной в результате мутаций или генетических рекомбинаций. На основе исследований, проведенных *in vitro*, было установлено, что *H. pylori* имеет природную устойчивость к гликопептидам (ванкомицину), сульфаниламидам, полимиксину, хинолонам первого поколения (налиндиксовой кислоте), триметоприму, противогрибковым препаратам (нистатину,

амфотерицину В) и циклогексимиду [1]. Эти препараты применяют в качестве ингибиторов роста посторонней микрофлоры при создании селективных и транспортных сред для культивирования *H. pylori*. Механизм приобретенной резистентности *H. pylori* связан преимущественно с возникновением точечных мутаций, а не с передачей R-плазмид и транспозонов. Также возможно приобретение резистентности путем трансформации при условии обитания двух разных штаммов *H. pylori* в желудке одного больного.

Как и у многих бактерий, у *H. pylori* возможно снижение чувствительности к ряду антибиотиков за счет механизма эффлюкса. Основной функцией эффлюкс-систем является выведение токсических субстанций, в том числе и антибиотиков, с помощью специальных эффлюкс-помп. Эффлюкс-помпы - это транспортеры белковой природы, локализованные в цитоплазматической мембране у всех клеток, как прокариот, так и эукариот. Активные, так называемые первичные, транспортеры нуждаются в источниках энергии для выполнения своих функций: они используют энергию, освобождающуюся при гидролизе аденозинтрифосфата. Пассивные, или вторичные, транспортеры функционируют без затраты энергии за счет разницы электрохимического потенциала, создаваемой при откачке ионов водорода и натрия. Эти эффлюкс-системы играют важную роль в возникновении множественной лекарственной устойчивости [3]. Генетические детерминанты эффлюкс-помп могут располагаться не только на хромосомах, но и на плаزمиде или транспозонах, что обуславливает легкость передачи этих генов. Антибиотики выступают в качестве индукторов или регуляторов экспрессии генов, кодирующих эффлюкс-системы, и проводят селективный отбор штаммов, обладающих этими механизмами.

В литературе имеются единичные сообщения об обнаружении эффлюкс-механизма резистентности к антибиотикам у *H. pylori*. D. Dailidienne и соавт. предположили, что резистентность *H. pylori* к тетрациклину может быть результатом мутации, нарушающей сродство тетрациклина к рибосоме, и/или результатом действия эффлюкс-помпы, выкачивающей этот антибиотик из клетки [4]. У штаммов *H. pylori* с индуцибельной резистентностью к тетрациклину в 2006 году был найден ген резистентности к тетрациклину HP1165, идентичный гену *tetA* *Clostridium perfringens*, ответственному за механизм эффлюкса тетрациклина из клетки [5]. Механизм эффлюкса TolC может играть роль в резистентности *H. pylori* к метронидазолу [6]. Описано несколько белков эффлюкс-систем *H. pylori*, возможно

играющих роль во множественной лекарственной устойчивости, но их роль окончательно не выяснена [7, 8].

Эти данные достаточно противоречивы. Так, J. Vina и соавт. [9], сравнив три эффлюкс-системы *H. pylori* с уже изученными у таких бактерий, как *Escherichia coli* и *Pseudomonas aeruginosa*, заключили, что этот механизм несколько отличается от присущего для грамотрицательных бактерий и не может играть большой роли во множественной лекарственной устойчивости. С. DeLoney и соавт. [10] исключили возможность участия механизма эффлюкса в резистентности к амоксициллину. Но независимо от резистентности к антибиотикам эффлюкс-системы *H. pylori* играют важную роль в сохранении гомеостаза ионов металлов, необходимого для адаптации этой бактерии в слизистых оболочках [11].

Приобретенную резистентность *H. pylori* подразделяют на первичную и вторичную: первичная имеет место до применения антибактериальных препаратов для эрадикации *H. pylori*, а вторичная – после неудачной эрадикационной терапии. В настоящее время описана резистентность *H. pylori* фактически ко всем препаратам, применяемым для эрадикационной терапии – макролидам, 5-нитроимидазолам, тетрациклинам, амоксициллину, фторхинолонам, рифампицину и фуразолидону.

**Резистентность к макролидам.** Механизм действия макролидов связан с ингибированием синтеза белка на уровне рибосом. Точкой приложения их действия является «петля» пептидилтрансферазы V домена 23S рРНК. Резистентность *H. pylori* к макролидам связана с точечной мутацией в гене 23S рРНК в двух позициях 2142 (A2142G и A2142C) и 2143 (A2143G), что приводит к изменению конфигурации рибосомы и снижению сродства антибиотика к мишени [12].

Из макролидов наибольшее использование в схемах эрадикационной терапии имеет кларитромицин в связи с низкой минимальной подавляющей концентрацией (МПК – 0,25 мг/л) против *H. pylori* и хорошими фармакодинамическими свойствами (отсутствие повышения МПК при снижении pH, что важно в кислой среде желудка). В начале 90-х годов XX столетия появились единичные сообщения о кларитромицинорезистентных штаммах, а во второй половине 90-х годов наметилась тенденция к увеличению числа таких штаммов. В настоящее время устойчивость *H. pylori* к кларитромицину варьирует в различных странах и регионах от 0 до 20–25%. В США количество резистентных к кларитромицину изолятов увеличивалось с 4% в 1993–1994 гг. до 12,6% в 1995–1996 гг. [13], сей-

час находится на уровне 10–15% в зависимости от штата [14]. Многоцентровое европейское исследование, проведенное в 17 странах, показало, что средний уровень резистентности к кларитромицину составляет 9,9% при значительных колебаниях в зависимости от региона, например на севере Европы – 9,3%, а на юге – 18% [15]. Исследование, проведенное в Италии, показало увеличение в 2 раза количества штаммов, устойчивых к кларитромицину, за последние 15 лет: с 10,2% до 21,3% с преобладанием мутации A2143G [16]. При этом распространенность кларитромицинорезистентных штаммов выше у детей, чем у взрослых, что может быть связано с более частым использованием макролидов у детей для лечения респираторных заболеваний [17]. Так, резистентность к кларитромицину штаммов *H. pylori*, выделенных от детей во Франции, выросла с 18,6% в 1993–1996 гг. до 41,6% в 2001–2004 гг. [18].

В России количество устойчивых к кларитромицину штаммов возросло с 8% в 1997 г. до 14,4% в 1998 г. и к 1999 г. уровень приблизился к средневропейскому – 17,1% [19]. Но в 2000 г. наметилась тенденция к снижению уровня резистентности *H. pylori* к кларитромицину (16,6%), которая продолжилась и в 2001 г. (13,8%) [20]. В России это может быть связано с заменой кларитромицина на более дешевые препараты в схемах эрадикационной терапии и ограничением его использования в виде монотерапии при лечении других инфекций. Однако наиболее вероятно это связано с незначительным количеством штаммов, исследованных в нашей стране.

Резистентность к кларитромицину оказывает большое влияние на эффективность эрадикации. При терапии по схеме ингибитор протонной помпы + кларитромицин + амоксициллин эрадикация составляла 87,8% при чувствительности *H. pylori* к кларитромицину, а при резистентности к нему – 18,3%, т.е. эффективность снижалась на 70% [21].

**Резистентность к нитроимидазолам.** Из нитроимидазолов для лечения *H. pylori* используют метронидазол и тинидазол. К обоим препаратам имеется перекрестная резистентность. Мишенью для их действия является структура ДНК. Чтобы стать активным, метронидазол должен проникнуть внутрь клетки. Там NO<sub>2</sub> группа восстанавливается в форму гидроксиламинового производного. Восстановленная форма вызывает повреждение ДНК и гибель бактерии. В основе генетических механизмов резистентности лежит мутация гена *rdxA*, кодирующего синтез кислород-нечувствительной нитроредуктазы, влияющей на превращение препарата в активную форму [22]. Другие

белки, такие как флавиноксиредуктазы, кодируемые геном *frA*, могут быть также вовлечены в процесс восстановления [23]. Кроме того, эффлюксо-помпа TolC может играть роль в резистентности к этой группе препаратов [6].

Мировое распространение резистентности *H. pylori* к метронидазолу имеет широкие границы. Так, в США и в Европе устойчивость к этому препарату находится в пределах от 20 до 40% [21, 24]. По данным многоцентрового европейского исследования, резистентность к метронидазолу составляла 33,1%, достигая в Южной Европе 40,8% [15]. В Японии отмечают наиболее низкий процент метронидазолорезистентных штаммов *H. pylori* (9–12%), что связывают с редким применением этого препарата [25]. Наивысший уровень распространенности резистентности к метронидазолу отмечают в развивающихся странах, где он составляет 50–80% [26, 27]. Первичная резистентность к метронидазолу в этих странах связана с широким применением этого препарата при лечении протозойных инфекций, в частности амебиоза. При применении метронидазола с целью эрадикации *H. pylori* часто развивается вторичная резистентность [28].

В России наблюдения за резистентностью к метронидазолу проводятся с 1996 года, когда было обнаружено превышение среднеевропейских показателей – 36,1%, с последующим ростом в 1997 г. до 42%, а в 1999 г. их количество достигло 56,5%. Затем, по данным Российской группы по изучению *H. pylori*, показатели резистентности к метронидазолу стабилизировались на уровне 55% в 2001 г. [19, 20]. Причиной высокой первичной резистентности *H. pylori* к метронидазолу в России может быть широкое использование этого препарата при лечении гинекологических заболеваний. В отдельных регионах продолжается рост числа устойчивых штаммов. Наивысший уровень резистентности к метронидазолу был зарегистрирован в Абакане – 79,4% [20]. Это, возможно, связано с широким применением производных 5-нитроимидазола для лечения описторхоза, эндемичного заболевания для этого региона.

Разброс показателей может быть связан с тем, что резистентность к метронидазолу находится под влиянием анаэробнозиса. Установлено, что резистентность к метронидазолу исчезает, если штаммы предварительно инкубировали в течение 4 часов в анаэробных условиях [29]. Достигнутый таким образом низкий окислительно-восстановительный потенциал ведет к ускоренному восстановлению метронидазола и появлению его активной формы. Находясь в своей экологической нише – слизистой оболочке желудочно-кишечного тракта, *H. pylori*

периодически попадает в анаэробные условия, что объясняет успешную эрадикацию у ряда больных с метронидазолорезистентными штаммами. Так, при лечении по схеме: ингибитор протонной помпы + кларитромицин + амоксициллин или метронидазол – эрадикация составляла 97% при чувствительности *H. pylori* к кларитромицину и метронидазолу, а при резистентности к метронидазолу – 72,6%, т. е. эффективность снижается только на 25% [21, 30]. Активация анаэробных метаболических путей, которые не функционируют в микроаэрофильных условиях, может быть причиной нестабильной резистентности, выявляемой при определении чувствительности *H. pylori* к метронидазолу *in vitro*, так как атмосфера инкубации во время культивирования полностью не контролируется. Большинство исследований показало отсутствие внутрилабораторной воспроизводимости опытов по исследованию чувствительности *H. pylori* к метронидазолу [31].

**Резистентность к бета-лактамам.** Аминопенициллиновый бета-лактам амоксициллин широко используется в схемах, направленных на эрадикацию *H. pylori*. Антибиотик действует на синтез пептидогликана, блокируя пенициллинсвязывающие белки. У небольшого количества штаммов обнаружена мутация в гене *pbp1A*. Связь резистентности к амоксициллину с множественными мутациями в гене *pbp1A* подтверждена независимыми исследованиями [32, 33]. Замена аминокислот Ser→Arg приводит к блокаде пенициллинового транспорта [34].

Случаев развития резистентности к амоксициллину при его клиническом применении пока официально не зарегистрировано, однако имеются сообщения о возрастании *минимальной подавляющей концентрации* (МПК) амоксициллина с 0,03 мг/л до 0,25–0,5 мг/л. Механизм такой относительной толерантности к амоксициллину может быть связан с отсутствием четвертого пенициллинсвязывающего белка, названного PBP-D (penicillin binding protein-D) [35]. В целом, резистентность к амоксициллину встречается крайне редко (не более 1%) [36]. Российской группой по изучению *H. pylori* было выделено три амоксициллинорезистентных штамма в 1996 году, в последующие годы таких штаммов выделено не было [19, 20].

**Резистентность к тетрациклинам.** Тетрациклины действуют на синтез белка на уровне рибосом путём связывания с 30S субъединицей. Резистентность к тетрациклинам, вероятно, связана с изменением нуклеотидного триплета AGA-926 на 928→TTC, сходного с изменением в позиции 965→967 у *E. coli*, что приводит к модификации

мишени для связывания тетрациклинов – петли h<sub>1</sub> [37]. Одиночная или двойная мутация в этих позициях приводят к формированию промежуточных значений МПК [4, 38]. Необходимость наличия трех замен нуклеотидных оснований может объяснить редкость развития резистентности к тетрациклинам. Описаны и тетрациклинорезистентные штаммы *H. pylori*, у которых отсутствовала мутация в позиции 926→928, но обнаружен механизм эффлюкса. У этих штаммов было снижено накопление антибиотика внутри клетки [39].

Резистентность *H. pylori* к тетрациклину в мире находится на низком уровне. Впервые единичные штаммы, устойчивые к этому препарату, были обнаружены в Австралии [40]. В России тетрациклинорезистентные штаммы *H. pylori* не выделены [19, 20]. В мире резистентность к тетрациклину составляет менее 1%, за исключением Южной Кореи, где она достигает 5,3% [41].

**Резистентность к фторхинолонам.** Фторхинолоны не являются обязательными компонентами схем эрадикационной терапии, рекомендованных III Маастрихтским консенсусом, но относятся к препаратам для терапии после неудачной эрадикации [2]. Мишенью действия фторхинолонов является фермент ДНК-гираза, ответственная за суперспирализацию ДНК, а именно субъединица А ДНК-гирасы, кодируемая геном *gyrA*. Резистентность к фторхинолонам *H. pylori* связана с изменениями нуклеотидных последовательностей в гене *gyrA* в позиции 87 или 91 [42].

В последнее время фторхинолоны широко используют для лечения многих заболеваний, что привело к высокому распространению первичной устойчивости *H. pylori* к этой группе препаратов. Так, в Португалии она составляет 20% [43]. Введение цiproфлоксацина в схемы лечения *H. pylori* в качестве резервного препарата привело к формированию вторичной резистентности, частота которой, по результатам немецких исследователей, составляет 9% [28].

**Резистентность к рифамицинам.** Рифамицины ингибируют субъединицу В ДНК-зависимой РНК-полимеразы, кодируемой геном *groB*. Мутации этого гена в позициях 524, 525, 585, описанные у *H. pylori*, такие же как у *Mycobacterium tuberculosis* и *E. coli* [44]. Также ранее обнаружена мутация в позиции 149 [45]. Устойчивость *H. pylori* к рифампицину практически не встречается, так как этот антибиотик используется ограниченно.

**Резистентность к нитрофуранам.** Нитрофураны, являясь акцепторами кислорода, нарушают клеточное дыхание бактерий и ингибируют биосинтез нуклеиновых кислот. В Китае обнару-

жена резистентность к фуразолидону на уровне 8,7% и идентифицировано 6 мутаций в генах *porD* и *oorD* у фуразолидонорезистентных изолятов [46]. Нитрофураны широко используются при лечении кишечных инфекций, воспалительных заболеваний нижних отделов мочевыделительной системы, вызванных граммотрицательными бактериями, и протозойных инфекций, в частности лямблиоза и трихомониаза. Это может обуславливать развитие первичной резистентности к фуразолидону. Фуразолидон включают в схемы лечения при безболевого формам впервые диагностированной неосложненной язвенной болезни и при лечении хронического гастрита (по желанию больного) в комбинации с коллоидным субцитратом висмута (де-нол) и антибиотиком (амоксциллином) [47]. Хотя этот химиотерапевтический препарат, обладающий противохеликобактерной активностью, не входит в рекомендованные схемы эрадикационной терапии «первой линии», но его низкая стоимость удешевляет курс лечения, что обуславливает его использование в странах с низким доходом населения. Это обстоятельство может привести к быстрому формированию вторичной резистентности к фуразолидону.

**Полирезистентность.** В последние годы растет количество полирезистентных штаммов, устойчивых к препаратам, применяемым для эрадикации – метронидазолу и кларитромицину. Появление таких штаммов оказывает негативное влияние на эффективность эрадикационной терапии. По данным F. Megraud, при терапии 14 пациентов с полирезистентными штаммами у 9 из них эрадикация не наступила [21]. Рост штаммов, одновременно резистентных к кларитромицину и метронидазолу, может быть обусловлен широким применением этих антибиотиков в одной схеме эрадикационной терапии. Причиной популярности этой схемы эрадикации являются высокие показатели излечения от *H. pylori*-инфекции – 90% при условии чувствительности *H. pylori* к обоим препаратам. Согласно рекомендациям III Маастрихтского Консенсуса (2005 г.) рекомендуемой терапией первой линии для популяций с количеством резистентных штаммов к кларитромицину менее 15–20% является следующая схема: ингибитор протонной помпы+кларитромицин+амоксциллин. В популяциях с частотой резистентности к метронидазолу менее 40% предпочтительнее другая схема: ингибитор протонной помпы+кларитромицин+метронидазол [2].

За первые три года наблюдений в России количество полирезистентных штаммов практически не изменялось и было на уровне 5,5% в 1996 г. и 6% в 1998 г. [19]. Этот период характеризовался

бурным ростом устойчивости к метронидазолу, но в то же время резистентность к кларитромицину росла медленно. Но как только Россия достигла европейского уровня кларитромицинорезистентности, соответственно сразу же возникла тенденция к росту полирезистентности: 8,5% в 1999 г., 10% – в 2000 г., 11,2% – в 2001 г. [20, 47].

#### **Типирование резистентных штаммов *H. pylori*.**

Результаты генотипирования штаммов *H. pylori* позволяют спрогнозировать не только эпидемиологические показатели заболеваний, ассоциированных с *H. pylori*-инфекцией, но и предсказать их динамику в результате лечения. Большой научный интерес представляет изучение чувствительности *H. pylori* к антимикробным препаратам и факторов патогенности [48]. К.И. Пюрвеева и соавт. при изучении неудачных случаев эрадикации выявили зависимость между генотипами *H. pylori* и наличием генов резистентности к кларитромицину [49]. De Francesco V. и соавт. обнаружили ассоциацию между CagA и VacA положительным статусом *H. pylori* и кларитромицинорезистентностью с помощью ПЦР в реальном времени [50]. Группа исследователей из Арабских Эмиратов под руководством S.A. Mubarak сообщила, что мутации гена резистентности к кларитромицину в позициях A(2142/43)G строго ассоциированы с генами патогенности *cagA* и *vacA* [51]. Исследования в этой области перспективны. Возможно, они позволят выделять группу или группы больных с определенными генотипами с высоким риском неудачной эрадикации и разработать мероприятия, позволяющие её избежать.

#### **Методы определения чувствительности *H. pylori* к антимикробным препаратам**

**Фенотипическое определение чувствительности *H. pylori* к антибактериальным препаратам.** Методы для определения чувствительности *H. pylori* к антимикробным препаратам были предложены Институтом по клиническим лабораторным стандартам США (NCCLS) [52]. Европейская группа по изучению *H. pylori* опубликовала методики, в целом сходные с американскими [31].

Метод серийных разведений на твердых питательных средах может быть использован в упрощенном варианте для тестирования влияния определенных концентраций антибиотиков на штаммы *H. pylori*. Например, по отношению к кларитромицину изоляты *H. pylori* делят на чувствительные ( $\leq 0,25$  мг/л), умеренно резистентные (0,5 мг/л) и резистентные ( $\geq 1$  мг/л). Поэтому для упрощенного тестирования рекомендовано исполь-

зовать две среды с концентрациями 0,25 и 1 мг/л. Пограничные концентрации для других антибиотиков: тетрациклин – 2 мг/л, рифабутин – 1 мг/л, ципрофлоксацин – 1 мг/л, метронидазол – 8 мг/л и т.д.

Метод разведения в жидких питательных средах имеет некоторые преимущества по сравнению с методом разведения на плотных средах – это возможность автоматизации учета результатов, но в связи с трудностью культивирования *H. pylori* в бульоне этот метод менее распространен [53–55].

Диско-диффузионный метод может быть использован для тестирования большинства химиотерапевтических препаратов, исключая метронидазол. Активация анаэробных метаболических путей, которые не функционируют в микроаэрофильных условиях, может быть причиной нестабильной резистентности *H. pylori* к метронидазолу [29]. Задержка между приготовлением среды и началом проведения этого теста может привести к изменению окислительно-восстановительного потенциала среды, что ограничивает использование этого метода для метронидазола. Наилучшие результаты получены при тестировании макролидов [56].

Е-тесты имеют преимущества в сравнении с диско-диффузионным методом, поскольку позволяют определить непосредственно минимальную подавляющую концентрацию. Причем результаты, полученные с помощью Е-тестов, коррелируют с результатами, полученными методами серийных разведений в плотных и жидких средах [31]. Ограничением использования Е-теста в практических лабораториях является его высокая стоимость.

**Генотипическое определение чувствительности *H. pylori* к антибактериальным препаратам.** Точечные мутации в ДНК *H. pylori*, связанные с формированием антибиотикорезистентности, могут быть обнаружены с помощью молекулярно-генетических методов. В настоящее время для определения генетических маркеров резистентности *H. pylori* предложены различные подходы, включая методы гибридизации с олигонуклеотидными зондами, анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов продуктов ПЦР (ПЦР-ПДРФ) и методы ПЦР в реальном времени.

ПЦР-ПДРФ был одним из первых методов, использованных для определения мутаций в гене *23S pPHK H. pylori*, связанных с резистентностью к кларитромицину. Метод основан на амплификации участка *23S pДНК* и селективном расщеплении ПЦР-продуктов с помощью эндонуклеаз рестрикции, распознающих сайты мутаций. Так, рестрикция с использованием эндонуклеаз BsaI и BsbI была использована для детекции нуклеотид-

ных замен A2142G и A2143G [57], а впоследствии расщепление эндонуклеазой ВсеAI предложено для определения мутации A2142C [58].

ПЦР в реальном времени с *резонансным переносом энергии флуоресценции* (FRET) была разработана для определения мутаций резистентности к кларитромицину у штаммов *H. pylori*, выделенных в чистой культуре [59], а позднее использована для выявления соответствующих мутаций непосредственно в биоптатах [60]. Благодаря высокой чувствительности метод может быть также использован для анализа образцов кала [61] и проведения неинвазивного обследования детей [62]. Идентификация мутаций осуществляется с помощью постамплификационного анализа кривых плавления зондов. Различия в температуре плавления ( $T_m$ ) зондов позволяют дифференцировать кларитромициночувствительные ( $T_m=62^\circ\text{C}$ ) и резистентные штаммы с мутациями: A2142C ( $T_m=58^\circ\text{C}$ ), A2143G ( $T_m=53^\circ\text{C}$ ) и A2142G ( $T_m=54^\circ\text{C}$ ). Этот метод имеет неоспоримые преимущества: быстрота (результат может быть получен через 2 часа) и отсутствие дополнительных манипуляций с ампликонами, что снижает риск контаминации.

Молекулярно-генетические методы исследования резистентности *H. pylori* разработаны и для других антибиотиков. В частности, описаны методы ПЦР в реальном времени с использованием FRET зондов [63] и аллель-специфичной ПЦР [64] для обнаружения резистентности *H. pylori* к фторхинолонам, а также ПЦР-ПДРФ для определения мутаций устойчивости к тетрациклинам [65].

**Гистологический метод.** Методику флуоресцентной *in situ* гибридизации (FISH) для выявления чувствительности к кларитромицину в биоптатах впервые предложили использовать К. Trebesius и соавт. в 2000 г. [66]. Этот метод позволяет обнаружить *H. pylori* с помощью зонда к участку видоспецифической последовательности 16S рРНК, меченного флюорохромом Су3, и второго флуоресцирующего зонда к участку последовательности 23S рРНК, несущему мутации резистентности к кларитромицину. Визуализация результатов осуществляется с помощью флуоресцентного микроскопа. Эту методику можно использовать при исследовании гистологических препаратов, зафиксированных формалином или после парафиновой заливки [67, 68].

### **Серологические методы определения чувствительности *H. pylori* к антибактериальным препаратам.**

Серологические методы основаны на обнаружении белка RdxA *H. pylori* – маркера гена резистентности к метронидазолу. Известно, что в основе генетических механизмов резистентности *H. pylori* к метронидазолу лежит мутация гена *rdxA*, кодирующего синтез кислород-нечувствительной нитроредуктазы, влияющей на превращение препарата в активную форму [22]. Для детекции этого гена предложено обнаружение его продукта – белка RdxA (24 kDa) с помощью иммуноблоттинга с использованием кроличьей сыворотки, содержащей специфические анти-RdxA антитела. Этот метод позволяет визуализировать полосу, соответствующую полосе RdxA белка у метронидазолочувствительных штаммов и её отсутствие у метронидазолорезистентных. Количество ложноположительных результатов составляет 10% [69].

### **Заключение**

Во всем мире и в нашей стране отмечена тенденция к распространению резистентности *H. pylori* к антибактериальным препаратам, рекомендованным для эрадикации. Устойчивость *H. pylori* к противохеликобактерной терапии значительно снижает её эффективность и приводит к формированию вторичной и множественной резистентности. Выявлены существенные различия в уровнях резистентности *H. pylori* к антимикробным препаратам в различных регионах нашей страны, что отражает и мировые тенденции. Эти факты указывают на назревшую необходимость проведения многоцентровых исследований по изучению резистентности *H. pylori* в регионах России. Широкое внедрение молекулярно-генетических методов исследований в практических лабораториях позволит выявлять циркуляцию резистентных штаммов и динамику их распространения, оценивать результаты эрадикационной терапии и, возможно, в будущем определять группы больных с определенными генотипами, резистентными к стандартным схемам противохеликобактерной терапии. Клинический мониторинг даст возможность прогнозировать эффективность противохеликобактерной терапии и разрабатывать альтернативные схемы лечения, что повысит качество и продолжительность жизни больных.

## Литература

- Mégraud F. Resistance of *Helicobacter pylori* to antibiotics. / In: Scarpignato C., Bianchi Porro G. Clinical pharmacology and therapy of *Helicobacter pylori* infection. Prog Basic Clin Pharmacol 1999; 11:329-45.
- Malfetheriner P., Megraud F., O'Morain C., et al. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection - The Maastricht III Consensus Report. Gut 2006; 10.
- Saidijam M., Benedetti G., Ren Q., et al. Microbial drug efflux proteins of the major facilitator superfamily. Curr Drug Targets 2006; 7:793-811.
- Dailidiene D., Bertoli M.T., Miciuleviciene J. Emergence of tetracycline resistance in: multiple mutational changes in 16S ribosomal DNA and other genetic loci. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:3940-46.
- Li Y., Dannelly H.K. Inactivation of the putative tetracycline resistance gene HP1165 in *Helicobacter pylori* led to loss of inducible tetracycline resistance. Arch Microbiol 2006; 185:255-62.
- van Amsterdam K., Bart A., van der Ende A. *Helicobacter pylori* TolC efflux pump confers resistance to metronidazole. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49:1477-82.
- Kutschke A., de Jonge B.L. Compound efflux in *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49:3009-10.
- Morrison S., Ward A., Hoyle C.J., Henderson P.J.F. Cloning, expression, purification and properties of a putative multidrug resistance efflux protein from *Helicobacter pylori*. Int J Antimicrob Agents 2003; 22:242-9.
- Bina J. E., Alm R.A., UriaNickelsen M., et al. *Helicobacter pylori* uptake and efflux: basis for intrinsic susceptibility to antibiotics *in vitro*. Antimicrob. Agents Chemother 2000; 44:248-54.
- DeLoney C.R., Schiller N.L. Characterization of an *in vitro*-selected amoxicillin-resistant strain of *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44:3368-73.
- Stahler F.N., Odenbreit S., Haas R., et al. The novel *Helicobacter pylori* CznABC metal efflux pump is required for cadmium, zinc, and nickel resistance, urease modulation, and gastric colonization. Infect Immun 2006; 74:3845-52.
- Occhialini A., Urdaci M., Doucet-Populaire F., et al. Macrolide resistance in *Helicobacter pylori*: rapid detection of point mutations and assays of macrolide binding to ribosomes. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:2724-8.
- Meyer J.M., Silliman N.P., Wang W.J., et al. Risk factors for *Helicobacter pylori* resistance in the United States: the surveillance of *H. pylori* Antimicrobial Resistance partnership (SHARP) Study, 1993-1999. Ann Int Med 2002; 136:13-24.
- Duck W. M., Sobel J., Pruckler J. M., et al. Antimicrobial resistance incidence and risk factors among *Helicobacter pylori*-infected persons, United States. Emerg Infect Dis 2004; 10:1088-94.
- Glupczynski Y., Megraud F., Lopez Brea M., Andersen L.P. European multicentre survey of *in vitro* antimicrobial resistance in *Helicobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2001; 20:820-3.
- De Francesco V., Margiotta M., Zulla A., et al. Prevalence of primary clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* strains over 15 year period in Italy. J Antimicrob Chemother 2007; 59:783-5.
- Koletzko S., Richy F., Bontems P., et al. Prospective multicentre study on antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains obtained from children living in Europe. Gut 2006; 55:1711-6.
- Raymond J., Burucoa C., Pietrini O., et al. Clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* isolated from French children: prevalence of the different mutations and coexistence of clones harboring two different mutations in the same biopsy. Helicobacter 2007; (12):157-63.
- Кудрявцева Л.В., Исаков В.А., Щербаков П.Л., Иваников И.О., Минаев В.И. Динамика резистентности штаммов *Helicobacter pylori* к антибиотикам у городского населения в России в 1996-1998 гг. В кн.: *Helicobacter pylori*: революция в гастроэнтерологии. Ивашкин В.Т., Мегро Ф., Лапина Т.Л. – М., Триада-Х, 1999, с.191-6.
- Кудрявцева Л.В. Состояние антибиотикорезистентности *Helicobacter pylori* в России. Эксп и клин гастроэнтерол 2003; 3:7.
- Mégraud F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. Gut 2004; 53:1374-84.
- Menz G.L., Megraud F. Is the molecular basis of metronidazole resistance in microaerophilic organisms understood? Trends Microbiol 2002; 10:370-5.
- Marais A., Bilardi C., Cantet F., Mendz G.L., Megraud F. Characterization of the genes *rdxA* and *frxA* involved in metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. Res Microbiol 2003; 154:137-44.
- Osato M.S., Reddy R., Reddy S. G., et al. Pattern of primary resistance of *Helicobacter pylori* to metronidazole or clarithromycin in the United States. Arch Int Med 2001; 161:1217-20.
- Perez Aldana L., Kato M., Nakagawa S., et al. The relationship between consumption of antimicrobial agents and the prevalence of primary *Helicobacter pylori* resistance. Helicobacter 2002; 7:306-9.
- Nahar S., Mukhopadhyay A.K., Khan R., et al. Antimicrobial susceptibility of *Helicobacter pylori* strains isolated in Bangladesh. J Clin Microbiol 2004; 42:4856-8.
- Torres J., Camorlinga Ponce M., Perez Perez G., et al. Increasing multidrug resistance in *Helicobacter pylori* strains isolated from children and adults in Mexico. J Clin Microbiol 2001; 39:2677-80.
- Heep M., Kist M., Strobel S., Beck D., Lehn N. Secondary resistance among 554 isolates of *Helicobacter pylori* after failure of therapy. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2000; 19:538-41.
- Cederbrant G., Kahlmeter G., Ljungh A. Proposed mechanism for metronidazole resistance in *Helicobacter pylori*. J Antimicrob Chemother 1992; 29:115-20.
- Wheeldon T.U., Granstrom M., Hoang T.T.H., et al. Importance of the level of metronidazole resistance for the success of *Helicobacter pylori* eradication. Aliment Pharmacol Ther 2004; 19:1315-21.
- Glupczynski Y., Broutet N., Cantagrel A., et al. Comparison of the E test and agar dilution method for anti-



- crobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 2002; 21:549-52.
32. Gerrits M.M., van Villet A.H., Kuipers E.J., Kusters J.G. *Helicobacter pylori* and antimicrobial resistance: molecular mechanisms and clinical implications. Lancet Infect Dis 2006; 6:699-709.
  33. Kim J.M., Kim J.S., Kim N., et al. Comparison of primary and secondary antimicrobial minimum inhibitory concentration for *Helicobacter pylori* isolated from Korean patients. Int J Antimicrob Agents 2006; 28:6-13.
  34. Gerrits M.M., Schuijffel D., van Zwet A.A., et al. Alterations in penicillin-binding protein 1A confer resistance to beta-lactam antibiotics in *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:2229-33.
  35. Dore M. P., Graham D.Y., Sepulveda A.R. Different penicillin-binding protein profiles in amoxicillin-resistant *Helicobacter pylori*. Helicobacter 1999; 4:154-61.
  36. Mégraud F., Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. Clinical Microbiology Reviews 2007; 20:280-322.
  37. Nonaka L., Connell S.R., Taylor D.E. 16S rRNA mutations that confer tetracycline resistance in *Helicobacter pylori* decrease drug binding in *Escherichia coli* ribosomes. J Bacteriol 2005; 187:3708-12.
  38. Gerrits M.M., Berning M., Van Vliet A.H.M., Kuipers E.J., Kusters J.G. Effects of 16S rRNA gene mutations on tetracycline resistance in *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:2984-86.
  39. Wu J.Y., Kim J.J., Reddy R., et al. Tetracycline-resistant clinical *Helicobacter pylori* isolates with and without mutations in 16S rRNA-encoding genes. Antimicrob Agents Chemother 2005; 49:578-83.
  40. Midolo P.D., Korman M.G., Turnbridge J.D., et al. *Helicobacter pylori* resistance to tetracycline. Lancet 1996; 347:1194-5.
  41. Kim J. J., Reddy R., Lee M., et al. Analysis of metronidazole, clarithromycin and tetracycline resistance of *Helicobacter pylori* isolates from Korea. J Antimicrob Chemother 2001; 47:459-61.
  42. Tankovic J., Lascols C., Sculo Q., et al. Single and double mutations in *gyrA* but not in *gyrB* are associated with low- and high-level fluoroquinolone resistance in *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother 2003; 47:3942-4.
  43. Cabrita J., Oleastro M., Matos R., et al. Features and trends in *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Lisbon area, Portugal (1990-1999). J Antimicrob Chemother 2000; 46:1029-31.
  44. Heep M., Rieger U., Beck D., Lehn N. Mutations in the beginning of the *groB* gene can induce resistance to rifamycins in both *Helicobacter pylori* and *Mycobacterium tuberculosis*. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44:1075-7.
  45. Heep M., Beck D., Bayerdorffer E., Lehn N. Rifampin and rifabutin resistance mechanism in *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:1497-9.
  46. Su Z., Xu H., Zhang C. et al. Mutations in *Helicobacter pylori* *porD* and *oorD* genes may contribute to furazolidone resistance. Croat Medical 2006; 47:410-5.
  47. Лазебник Л.,Б., Морозов И.А., Ильиченко А.А., Хомерики С.Г. Проблемы и перспективы исследования инфекции *Helicobacter pylori*. Экспериментальная гастроэнтерология 2006; 2:4-14.
  48. Godoy A.P., Ribeiro M.L., Benvenuto Y.H. et al. Analysis of antimicrobial susceptibility and virulence factors in *Helicobacter pylori* clinical isolates. BMC Gastroenterol 2003; 3:20.
  49. Пурвеева К.В., Лапина Т.Л., Момыналиев К.Т. и соавт. Генотипирование в клинической практике ведения больных язвенной болезнью двенадцатиперстной кишки. Рос журнал гастроэнтерол, гепатолог, колопроктол 2003; 3(ХIII):21-4.
  50. De Francesco V., Margiotta M., Zulla A., et al. Clarithromycin resistance and *Helicobacter pylori* genotypes in Italy. J Microbiol 2006; 28:6-13.
  51. Mubarak S.A., Adeel Islam A., Abida A.E. Analysis of *Helicobacter pylori* antimicrobial susceptibility and virulence genes in gastric mucosal biopsies in the United Arab Emirates. Indian J Gastroenterol 2007; 26:221-4.
  52. NCCLS. 1995. Performance standards for antimicrobial susceptibilities testing. M7-A3. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Villanova, PA.
  53. Coudron P.E., Stratton C.W. Factors affecting growth and susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in liquid media. J Clin Microbiol 1995; 33:1028-30.
  54. Hachem C.Y., Clarridge J.E., Reddy R., et al. Antimicrobial susceptibility testing of *Helicobacter pylori*: comparison of E-test, broth microdilution, and disk diffusion for ampicillin, clarithromycin, and metronidazole. Diagn Microbiol Infect Dis 1996; 24:37-41.
  55. Piccolomini R., Di Bonaventura G., Catamo G., et al. Comparative evaluation of the E-test, agar dilution, and broth microdilution for testing susceptibilities of *Helicobacter pylori* strains to 20 antimicrobial agents. J Clin Microbiol 1997; 35:1842-6.
  56. Grignon B., Tankovic J., Mégraud F., et al. Validation of diffusion methods for macrolide susceptibility testing of *Helicobacter pylori*. Microb Drug Resist 2002; 8:61-6.
  57. Versalovic J., Shortridge D., Kibler K., et al. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori*. Antimicrob Agents Chemother 1996; 40:477-80.
  58. Ménard A., Santos A., Mégraud F., Oleastro M. PCR-restriction fragment length polymorphism can also detect point mutation A2142C in the 23S rRNA gene, associated with *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin. Antimicrob Agents Chemother 2002; 46:1156-7.
  59. Gibson J.R., Saunders N.A., Burke B., Owen R.J. Novel method for rapid determination of clarithromycin sensitivity in *Helicobacter pylori*. J Clin Microbiol 1999; 37:3746-8.
  60. Chisholm S.A., Owen R.J., Teare E.L., Saverymuttu S. PCR-based diagnosis of *Helicobacter pylori* infection and real-time determination of clarithromycin resistance directly from *Helicobacter pylori* human gastric biopsy samples. J Clin Microbiol 2001; 39:1217-20.
  61. Schabereiter-Gurtner C., Hirschl A.M., Dragosics B., et al. Novel real-time PCR assay for detection of *Helicobacter*

- pylori* infection and simultaneous clarithromycin susceptibility testing of stool and biopsy specimens. J Clin Microbiol 2004; 42:4512-8.
62. Lottspeich C., Schwarzer A., Panthel K. Koletzko S., Russmann H. Evaluation of the novel *H.pylori* ClariRes Real-Time PCR Assay for detection and clarithromycin susceptibility testing of *Helicobacter pylori* in stool specimens from symptomatic children. J Clin Microbiol 2007; 45:1718-22.
63. Glocker E., Kist M. Rapid detection of point mutations in the *gyrA* gene of *Helicobacter pylori* conferring resistance to ciprofloxacin by a fluorescence resonance energy transfer-based real-time PCR approach. J Clin Microbiol 2004; 42:2241-6.
64. Nishizawa T., Suzuki H., Umezawa A., et al. Rapid detection of point mutations conferring resistance to fluoroquinolone in *gyrA* of *Helicobacter pylori* by allele-specific PCR. J Clin Microbiol 2007; 45:303-5.
65. Ribeiro M.L., Gerrits M. M., Benvengo Y.H.B., et al. Detection of high-level tetracycline resistance in clinical isolates of *Helicobacter pylori* using PCR-RFLP. FEMS Immunol Med Microbiol 2004; 40:57-61.
66. Trebesius K., Panthel K., Strobel S., et al. Rapid and specific detection of *Helicobacter pylori* macrolide resistance in gastric tissue by fluorescent *in situ* hybridisation. Gut 2000; 46:608-14.
67. Samarbaf-Zadeh A.R., Tajbakhsh S., Moosavian S.M., et al. Application of fluorescent *in situ* hybridization (FISH) for the detection of *Helicobacter pylori*. Med Sci Monit 2006; 12:426-30.
68. Yilmaz O., Demiray E., Търмер S., et al. Detection of *Helicobacter pylori* and determination of clarithromycin susceptibility using formalin-fixed, paraffin-embedded gastric biopsy specimens by fluorescence *in situ* hybridization. Helicobacter 2007; 12:136-41.
69. Latham S.R., Labigne A., Jenks P.J. Production of the RdxA protein in metronidazole-susceptible and – resistant isolates of *Helicobacter pylori* cultured from treated mice. J Antimicrob Chemother 2002; 49:675-8.