



В. В. Власенко¹, І. Г. Власенко², А. О. Новицький^{1,3}

¹ Вінницький національний аграрний університет

² Вінницький торговельно-економічний інститут КНТЕУ

³ Вінницька центральна районна клінічна лікарня

Визначення чутливості *Helicobacter pylori* до кларитроміцину методом полімеразної ланцюгової реакції

Мета — оцінити генетичні зміни в зразках біоптатів шлунка у *H. pylori*-позитивних пацієнтів, які призводять до резистентності до кларитроміцину, і порівняти їх з даними гістології.

Матеріали та методи. Проаналізовано 180 зразків 90 пацієнтів (по одному зразку до та після лікування). Застосовано метод полімеразної ланцюгової реакції, який дає змогу безпосередньо ідентифікувати мутації у гені 23S рРНК *H. pylori*.

Результати. У групі хворих з вдалою ерадикацією виявлено 94,2% штамів *H. pylori* дикого типу і 1,7% мутацій, у групі з невдалими лікуванням — 10,0% штамів дикого типу, 66,7% мутацій і 23,3% змішаних генотипів. У 17 випадках мутації корелювали зі слабким, у 14 — з помірним і у 5 — з вираженим запаленням, у 21 випадку — з легкою, в 11 — з помірною і у 4 — з вираженою активністю.

Висновки. Генетична мінливість дає змогу виживати *H. pylori* у несприятливому середовищі, розвивати резистентність до антибактеріальних препаратів. Виявлено статистично достовірну кореляцію між мутаціями в гені гелікобактерної 23S рРНК і гістологічними параметрами гастриту, такими як тяжкість запалення, активність гастриту, щільність заселення *H. pylori*.

Ключові слова: *Helicobacter pylori*, полімеразна ланцюгова реакція, резистентність, кларитроміцин.

Зі схем, які використовують для лікування інфекції *Helicobacter pylori*, найкращі результати ерадикації отримують у разі використання інгібіторів протонної помпи (ІПП) у комбінації з двома антибіотиками, переважно з амоксициліном та кларитроміцином або метронідазолом. Однак у 21–25% випадків така схема терапії не ефективна [9]. У світі зростає первинна резистентність до кларитроміцину. Це вважають основним чинником, який знижує ефективність антигелікобактерної терапії [5, 6]. Основною причиною відсутності чутливості *H. pylori* до макролідів є відсутність зв'язку препаратів з 23S рРНК-компонентом бактеріальної рибосоми через трансверсії аденін-гуанін у положенні 2142 і 2143 та аденін-цитозин у позиції 2142, які включені в пептидилтрансферази 23S рРНК [11].

Мета роботи — вивчити генетичні зміни *H. pylori* в зразках шлункових біоптатів *H. pylori*-позитивних пацієнтів, які призводять до резис-

тентності до кларитроміцину і порівняти їх з даними гістології.

Матеріали та методи

У дослідження увійшли 90 *H. pylori*-позитивних пацієнтів з хронічним гастритом типу В та виразковою хворобою дванадцятипалої кишки, які проходили фіброгастродуоденоскопію (ФГДС) зі взяттям біопсій, отриманих з середньої частини великої кривизни тіла шлунка та антрального відділу шлунка, для гістологічного дослідження та виконання полімеразної ланцюгової реакції (ПЛР). Критерії виключення з дослідження: в анамнезі вживання кларитроміцину, наявність декомпенсованої супутньої патології, вік до 18 років, обстеження в інших лікувально-профілактичних закладах, проживання за межами Вінницького району, уживання антисекреторних препаратів за 4 доби до дослідження, використання імуносупресорів або хімотерапевтичних, протизапальних препаратів, антагоністів H_2 -рецепторів, антимікробних препаратів і/або похідних нітроїмідазолу

та/або сполук вісмуту менше 4 тижнів до початку досліджень, вагітні та жінки, що годували груддю, наявність кровотеч, алергічні реакції на середники, плановані до застосування. Після першої ФГДС хворі отримували стандартну потрійну антихелікобактерну терапію на основі ППП (езомепразол) плюс два антибіотики (кларитроміцин та амоксицилін) протягом 7 днів [7]. Через чотири тижні після закінчення лікування пацієнти проходили контрольну ФГДС з біопсією для гістологічного дослідження та ПЛР. Залежно від наявності чи відсутності у хворих *H. pylori* вони були розділені на 2 групи: група А — 60 осіб, пролікованих успішно (26 чоловіків і 34 жінки, середній вік — $(41,0 \pm 11,8)$ року), група Б — 30 осіб, у яких терапія була неефективною (14 чоловіків та 16 жінок, середній вік — $(46,0 \pm 9,2)$ року).

При аналізі біопсійних зразків слизової оболонки шлунка ми застосували метод ПЛР, який дає змогу безпосередньо ідентифікувати і мутації в 23S рРНК *H. pylori*. Ми спробували провести кореляцію щільності розміщення *H. pylori* у слизовій оболонці з гістологічною картиною, визначеною за Сіднейською класифікацією.

Досліджено 180 біоптатів (один до і один після терапії дев'яноста пацієнтів), отриманих зі слизової оболонки шлунка. Виконували зрізи тканин (4 мкм завтовшки), які фарбували гематоксилином та еозином для гістологічного дослідження і визначення кишкової метаплазії за Май-Грюнвальд—Гімзою для ідентифікації *H. pylori*. Проведений напівкількісний опис гістологічної картини відповідно до Сіднейської класифікації [10]. Гістологічні зміни (запалення, активність, атрофія, кишкова метаплазія і колонізація *H. pylori*) оцінювали за такими градаціями: легкий, помірний, тяжкий.

Для виявлення мутації в 23S рРНК *H. pylori* використано набір Helicobacter pylori real time PCR Kit (Clarithromycin resistance) (AnDiaTec GmbH & Co., Kornwestheim, Німеччина).

Етапи ПЛР:

1. Підготовка проб і виділення ДНК.
2. Підготовка суміші ферментів.
3. Ампліфікація і комбіноване виявлення ДНК-матриць з визначенням кривих плавлення.
4. Інтерпретація генотипів з використанням програмного забезпечення та аналіз кривої плавлення.

Ампліфікацію проводили на апараті qTower 2.0 (Analytik Jena, Німеччина). Денатурацію здійснювали за температури 95 °С, відпал праймерів — 54 °С, елонгацію — 72 °С.

Значення кривих плавлення контролю наведено у табл. 1.

Кількість бактерій для бактеріального зразка розраховували шляхом інтерполяції від стандартної кривої. Для порівняння щільностей, отриманих методом ПЛР і гістологічно, значення, отримані при ПЛР, були перетворені в десяткове логарифмічне значення.

Для порівняння гістологічних параметрів Сіднейської класифікації з ураженнями генома і бактеріальною щільністю використано непараметричний критерій Крускала—Уолліса. Для оцінки кореляції між щільністю геномів *H. pylori* і розподілом *H. pylori* в біопсійних зразках розраховували коефіцієнт рангової кореляції Спірмена. Значення $p < 0,05$ розглядали як статистично достовірне.

Результати та обговорення

Гістологічні дані наведено в табл. 2.

Пряме виявлення мутації, які спричинили резистентність до кларитроміцину Helicobacter pylori real time PCR Kit (Clarithromycin resistance) (AnDiaTec GmbH & Co., Kornwestheim, Німеччина) для детекції точкових мутацій у гені 23S рРНК застосовано для визначення резистентності до кларитроміцину у 180 зразків біоптатів шлунка до і після антихелікобактерної терапії (група А — 120 зразків, група Б — 60 зразків). У 3 біопсійних зразках з групи А не отримано продуктів ампліфікації через фрагментовану ДНК. Унаслідок проведення ПЛР та аналізу екстрактів ДНК контрольних штамів *H. pylori* отримано криві плавлення з температурами плавлення, описаними вище.

У табл. 3 представлені дані щодо кількості мутацій у гені 23S рРНК *H. pylori*.

У групі А в 1 випадку виявлено мутацію в гені 23S рРНК, ще в 1 випадку — змішаний генотип, хоча ерадикаційна терапія в усіх пацієнтів групи А була ефективною.

У 20 *H. pylori*-позитивних кларитроміцин-резистентних пацієнтів групи Б встановлено мутовані штами *H. pylori*. У 7 з 30 пацієнтів (23,3%) результати ПЛР свідчили про наявність як дикого типу, так і мутантних (змішаних) генотипів. У

Таблиця 1. Аналіз кривих плавлення контролю, °С

Варіант контролю	Канал F2/F1	Канал F3/F1
Дикий тип	$64,5 \pm 1$	$60,5 \pm 1$
Мутований тип	$59,5 \pm 1$	$66,5 \pm 1$
Негативний	Кривої немає	Кривої немає

Таблиця 2. Розподіл біопсійних зразків залежно від тяжкості гелікобактерного гастриту за оновленою Сіднейською класифікацією

Тяжкість виявів	Слабка		Помірна		Тяжка		Усього	
	А	Б	А	Б	А	Б	А	Б
Запалення	71 (59,2%)	25 (41,7%)	35 (29,2%)	29 (48,3%)	2 (1,7%)	6 (10,0%)	108	60
Активність	70 (58,3%)	36 (60,0%)	25 (20,8%)	19 (31,7%)	2 (1,7%)	5 (8,3%)	97	60
Атрофія	64 (53,3%)	31 (51,7%)	30 (25,0%)	27 (45,0%)	2 (1,7%)	0 (0,0%)	96	58
Кишкова метаплазія	28 (23,3%)	19 (31,7%)	16 (13,3%)	5 (8,3%)	7 (5,8%)	3 (5,0%)	51	27
Щільність <i>H. pylori</i>	34 (28,3%)	37 (61,7%)	21 (17,5%)	16 (26,7%)	6 (5,0%)	7 (11,7%)	61	60

Таблиця 3. Мутації у гені 23S рРНК *H. pylori*

Генотип	Кількість хворих	
	Група А*	Група Б
Дикий тип	55 (96,5%)	3 (10,0%)
Мутація 23S рРНК	1 (1,8%)	20 (66,7%)
Змішаний генотип	1 (1,8%)	7 (23,3%)

* У 3 біопсійних зразках групи А ампліфікації отримано не було через неадекватну або фрагментовану ДНК.

всіх цих випадках штами *H. pylori* були резистентні до кларитроміцину.

Криві плавлення, отримані з екстракту ДНК *H. pylori* пацієнтів зі змішаними (дикого типу і мутовані) бактеріальними генотипами, наведено на рисунку.

Порівняння генетичних змін і даних гістології

Виявлено статистично значущий зв'язок між майже всіма параметрами Сіднейської класифікації і мутаціями гена 23S рРНК *H. pylori*, крім атрофії і кишкової метаплазії (див. табл. 3). Так, у 17 випадках мутації корелювали зі слабким, у 14 — з помірним і у 5 — з вираженим запаленням; у 21 випадку — з легкою, в 11 — з помірною і у 4 — з вираженою активністю. Щільність розміщення *H. pylori* на слизовій оболонці корелювала зі зміненними генотипами, особливо при колонізації слабого і помірного ступеня (22 і 12 випадків відповідно). Лише 2 випадки з вираженою колонізацією були спричинені бактеріями зі змішаним генотипом на відміну від випадків з колонізацією легкою і середнього ступеня, спричинених 9 змішаними генотипами у пацієнтів обох груп.

Кількісне визначення щільності заселення бактеріями слизової оболонки

Гістологічним методом ми виявили, що щільність розміщення *H. pylori* була більшою в антру-

мі, ніж у тілі шлунка. Методом ПЛР цей параметр оцінено на 64 ПЛР-позитивних зразках. Його величина становила від 30 до 65 000 ДНК бактерій у зразку біоптата. Виявлено значуща кореляція між ступенем бактеріальної щільності, оціненою за допомогою ПЛР та гістології, особливо між класами 1 і 3 ($p < 0,001$). Середня щільність геномів *H. pylori* була вищою при легкому ($p < 0,05$), помірному ($p < 0,001$) і важкому ($p < 0,001$) ступені гістологічних змін без достовірних відмінностей між сусідніми ступенями. Виявлено геноми *H. pylori* у невеликих кількостях у чверті зразків, тоді як гістологічно мікроорганізми не виявлялись.

Оціночна шкала, застосована у нашому дослідженні, яка ґрунтується на Сіднейській класифікації, дала змогу об'єктивно оцінити гістологічну картину гелікобактерного гастриту і ефективність лікування. Методом ПЛР можна було виявити щонайменше 30 бактеріальних клітин (близько 60 копій гена *H. pylori*) у зразках шлункових біоптатів, що свідчить про високу чутливість цього методу.

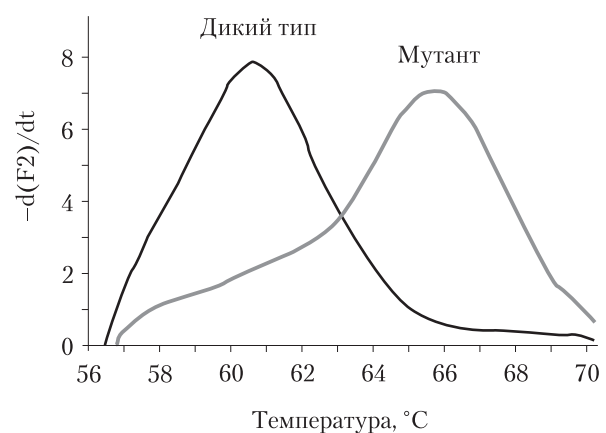


Рисунок. Криві плавлення, отримані з екстрактів ДНК пацієнтів, інфікованих змішаними генотипами *H. pylori*: температура плавлення чутливого генотипу — 60,5 °С, стійкого — 66,5 °С.

У нашому дослідженні найчастіше (у 90 % випадків) траплялася точкова мутація з переходом аденін-гуанін (2142–2143). Ця мутація переважає серед штамів *H. pylori* в Європі (понад 85 % випадків) [8]. Той факт, що у 3 із 30 випадків у групі Б не виявлено генетичних змін, можна пояснити наявністю інших мутацій (наприклад, A2115G, G2141A, T2147G тощо), які також можуть бути пов'язані з резистентністю до кларитроміцину, або механізмів, не зв'язаних з генетичною послідовністю 23S рРНК (наприклад, наявність ефлюкс-механізму), котрі можуть відігравати важливу роль у формуванні резистентності.

Цікаво було дослідити, чи зберігається штам після лікування. Якщо з'являється новий штам, то чи пов'язане це явище з резистентністю до кларитроміцину? Проведені експерименти з генотипування засвідчили, що у разі, якщо штам чутливий до попереднього лікування, то невдачі ерадикації пов'язані або зі збереженням штаму, або з появою нового штаму.

Нам вдалося виявити наявність мутантного штаму серед диких штамів на рівні менше ніж 12 %. Фактично у 16 із 42 випадків генетичних змін зафіксовано змішаний генотип *H. pylori*, який складався з мутантних штамів і штамів дикого типу. У дослідженні E. Cambau та співавт. понад 30 % штамів *H. pylori*, наявних у зразках шлункової біопсії, були змішаними [4]. Можна припустити, що або різні штами співіснують у слизовій оболонці шлунка, або в одного і того самого штаму існують як мутантні алелі, так і алелі дикого типу. У чотирьох випадках серед чутливих до кларитроміцину штамів *H. pylori* також вдалося виявити наявність як дикого штаму, так і мутантів аденін-гуанін та аденін-цитозин. Цей факт можна пояснити тим, що або стійкі штами були наявні у невеликій кількості, або два генотипи можуть відповідати різним алелям гена 23S рРНК одного штаму.

При порівнянні генетичних і гістологічних даних, ми виявили значну статистично достовірну кореляцію між генетичними змінами та гістологічними характеристиками гастриту, такими як тяжкість запалення, активність і щільність заселення бактеріями ($p < 0,05$). Як показали наші дослідження, накопичення мутації і/або змішання генотипів поширені серед пацієнтів з м'якою і помірною активністю запалення.

Ми також застосували кількісну ПЛР для підрахунку кількості клітин *H. pylori*. Цей спосіб дає змогу надійно визначати від 30 бактерій і більше у біопсійних зразках. Установлено, що щільність заселення мікроорганізмами, визначена за допомогою ПЛР, статистично достовірно

корелює з напівкількісною гістологічною оцінкою. Вимірювання щільності заселення гелікобактерами слизової оболонки може бути корисним, коли тяжкість інфекції має клінічне або патологічне значення.

Найбільш вражаючим результатом нашого дослідження було те, що майже в усіх випадках з ерадикацією *H. pylori*, які були гістологічно негативними, при аналізі ПЛР виявлено різні кількості ДНК *H. pylori*. Ми припустили, що, можливо, це форми гелікобактерів, які не визначаються при фарбуванні гематоксиліном та еозином або за Гімзою. Відомо, що *H. pylori* існує у двох формах: активній вигнутій формі, яка ділиться, і кокоподібній [3]. З'являється дедалі більше свідчень того, що остання форма є не просто дегенеративним морфологічним виявом, невидимим під час мікроскопічного дослідження, а живою і, можливо, метаболічно активною [3]. У такому разі концентрації антибіотиків повинні бути вищими і підтримуватись довше, оскільки це потрібно не лише для того, щоб убити позаклітинні мікроорганізми, а й щоб проникнути в епітеліальні клітини для ліквідації внутрішньоклітинних *H. pylori*. Схожі результати отримані в дослідженні S. Gazi та співавт. [5].

Висновки

Вживати *H. pylori* у несприятливому середовищі дає змогу генетична мінливість, яка також дає можливість *H. pylori* розвивати резистентність до антибактеріальних препаратів.

Виявлено статистично достовірну кореляцію між мутаціями в гені гелікобактерної 23S рРНК і гістологічними параметрами гастриту, такими як тяжкість запалення, активність гастриту, щільність заселення *H. pylori*.

Накопичення мутацій і/або змішаного генотипу поширені переважно серед пацієнтів з м'якою і помірною активністю запалення. Ці дані дають підставу припустити, що наявність обох стійких і сприйнятливих до кларитроміцину штамів *H. pylori* може бути причиною невдалої терапії.

Щільність заселення *H. pylori* слизової оболонки шлунка корелює з накопиченням генетичних уражень, які призводять до резистентності до кларитроміцину.

Перспективи подальших досліджень. Необхідно провести дослідження з більшою кількістю обстежених для визначення рівня у популяції інфікованості гелікобактерами з мутованими генотипами, а також вивчення методом ПЛР резистентності *H. pylori* до інших антигелікобактерних препаратів.

Список літератури

1. Германюк Т. А., Дзюбенко С. П. Дослідження фармацевтичного ринку антигелікобактерних препаратів та аналіз мінімізації витрат антигелікобактерної терапії // Актуал. пит. фармацевтич. і мед. науки та практ. — 2012. — № 2 (9). — С. 102—106.
2. Лапина Т. Л. Две цели лечения язвенной болезни — заживление язвы и эрадикация *Helicobacter pylori* // Сучасна гастроентерол. — 2010. — № 3 (53). — С. 48—53.
3. Andersen L. P., Rasmussen L. *Helicobacter pylori*-coccoid forms and biofilm formation // FEMS Immunol. Med. Microbiol. — 2009. — N 2 (56). — P. 112—115.
4. Cambau E., Allerheiligen V., Coulon C. et al. Evaluation of a new test, genotype HelicoDR, for molecular detection of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori* // J. Clin. Microbiol. — 2009. — N 47. — P. 3600—3607.
5. Gazi S., Karameris A., Christoforou M. Real-Time PCR detection and quantitation of *Helicobacter pylori* clarithromycin-resistant strains in archival material and correlation with Sydney classification // Ann. Gastroenterol. — 2013. — N 26. — P. 226—232.
6. Horiki N., Omata F., Uemura M. et al. Annual change of primary resistance to clarithromycin among *Helicobacter pylori* isolates from 1996 through 2008 in Japan // *Helicobacter*. — 2009. — N 14. — P. 86—90.
7. Malfertheiner P., Megraud F., O'Morain C. A. et al. Management of *Helicobacter pylori* infection — the Maastricht IV/Florence Consensus Report // *Gut*. — 2012. — N 61. — P. 646—664.
8. Megraud F., Coenen S., Versporten A. et al. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe and its relationship to antibiotic consumption // *Gut*. — 2013. — N 62 (1). — P. 34—42.
9. O'Connor A., Gisbert J. P., McNamara D., O'Morain C. Treatment of *Helicobacter pylori* Infection // *Helicobacter*. — 2011. — № 16 (Suppl. 1). — P. 53—58.
10. Ohkusa T., Fujiki K., Takashimizu I. et al. Endoscopic and histological comparison of nonulcer dyspepsia with and without *Helicobacter pylori* infection evaluated by the modified Sydney system. // *Am. J. Gastroenterol.* — 2000. — № 95. — P. 2195—2199.
11. Schmitt B. H., Regner M., Mangold K. A. et al. PCR detection of clarithromycin-susceptible and -resistant *Helicobacter pylori* from formalin-fixed, paraffin-embedded gastric biopsies // *Mod. Pathol.* — 2013. — N 26 (9). — P. 1222—1227.

В. В. Власенко¹, И. Г. Власенко², А. А. Новицкий^{1,3}

¹ Винницкий национальный аграрный университет

² Винницкий торгово-экономический институт КНТЭУ

³ Винницкая центральная районная клиническая больница

Определение чувствительности *Helicobacter pylori* к кларитромицину методом полимеразной цепной реакции

Цель — оценить генетические изменения в образцах биоптатов желудка у *H. pylori*-положительных пациентов, которые приводят к резистентности к кларитромицину, и сравнить их с данными гистологии.

Материалы и методы. Проанализированы 180 образцов 90 пациентов (по одному образцу до и после лечения). Применили метод полимеразной цепной реакции, позволяющий непосредственно идентифицировать мутации в гене 23S рРНК *H. pylori*.

Результаты. В группе больных с удачной эрадикацией выявлено 94,2% штаммов *H. pylori* дикого типа и 1,7% мутаций, в группе с неудачным лечением — 10,0% штаммов дикого типа, 66,7% мутаций и 23,3% смешанных генотипов. В 17 случаях мутации коррелировали со слабым, в 14 — с умеренным и в 5 — с выраженным воспалением, в 21 случае — с легкой, в 11 — с умеренной и в 4 — с выраженной активностью.

Выводы. Генетическая изменчивость позволяет выживать *H. pylori* в неблагоприятной среде, развивать резистентность к антибактериальным препаратам. Выявлена статистически достоверная корреляция между мутациями в гене хеликобактерной 23S рРНК и гистологическими параметрами гастрита, такими как тяжесть воспаления, активность гастрита, плотность заселения *H. pylori*.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, полимеразная цепная реакция, резистентность, кларитромицин.

V. V. Vlasenko¹, I. G. Vlasenko², A. O. Novytskyi^{1,3}

¹ Vinnytsya National Agricultural University

² Vinnytsya Commerce and Economic Institute of KNTEU

³ Vinnytsya Central Regional Clinical Hospital

Clarithromycin sensitivity test for *Helicobacter pylori* with polymerase chain reaction

Objective — to assess the genetic changes in the gastric biopsy specimens of *H. pylori*-positive patients, resulting in the clarithromycin resistance and to compare them with histological data.

Materials and methods. The analysis has been performed on 180 specimens from 90 patients (one specimen before the treatment, and one after it). The polymerase chain reaction (PCR) was used, which allows direct identification of different mutations in the 23S rRNA of *H. pylori*.

Results. In the group of patients with successful eradication 94.2 % of the wild type strains of *H. pylori* were identified, and 1.7 % of mutations. In the group with treatment failure there were 10 % of wild-type strains, 66.7 % of mutations and 23.3 % of mixed genotype. In 17 cases, the mutations correlated with low grade inflammation, in 14 case with moderate and in 5 cases with severe inflammation; in 21 cases, the mutations correlated with mild activity, in 11 cases with moderate, and 4 cases with severe activity.

Conclusions. The genetic variability of *H. pylori* allows the bacteria to survive in a rather hostile environment. This affects the ability of *H. pylori* to develop resistance to antibiotics. The authors established statistically significant correlation between mutations in the 23S rRNA of *H. pylori* with histological parameters of gastritis.

Key words: *Helicobacter pylori*, polymerase chain reaction, resistance, clarithromycin.

Контактна інформація

Власенко Володимир Васильович, д. біол. н., проф., зав. кафедри
21008, м. Вінниця, вул. Сонячна, 3

Стаття надійшла до редакції 23 грудня 2013 р.