

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКОЕ ТЕСТИРОВАНИЕ МУТАЦИЙ ГЕНА 23S
pРНК *HELICOBACTER PYLORI*, ОПРЕДЕЛЯЮЩИХ РЕЗИСТЕНТНОСТЬ
К КЛАРИТРОМИЦИНУ В БЕЛАРУСИ**

¹ГУ «РНПЦ радиационной медицины и экологии человека», г. Гомель, Беларусь

²УО «Гомельский государственный медицинский университет», г. Гомель, Беларусь

³ГУ «Гомельская городская больница скорой медицинской помощи», г. Гомель, Беларусь

⁴УО «Витебский государственный медицинский университет», г. Витебск, Беларусь

Проведено определение частоты встречаемости точечных мутаций формирующих резистентность к кларитромицину в Беларуси методом ПЦР-ПДРФ. Обследовано 145 человек с доказанным инфицированием *H.pylori*. В ходе рестрикционного анализа фрагмента гена 23S rRNA *H.pylori* были выявлены точечные мутации T2182C (3,44%), A2142G/C (0,69%) и A2143G (1,38%). Таким образом, точечные мутации, формирующие резистентность к кларитромицину, выявлены у 5,5% обследуемых пациентов. В значительной степени резистентность к кларитромицину в Беларуси обусловлена присутствием точечной мутации T2182C (62,5%). Применение ПЦР-ПДРФ в лабораторной диагностике позволяет диагностировать доминирующие мутантные генотипы формирующие резистентность *H. pylori* к кларитромицину.

Ключевые слова: *H.pylori*, кларитромицин, ПЦР-ПДРФ, точечная мутация, резистентность

Введение

Helicobacter pylori-инфекция является одной из наиболее распространенных в мире [1]. Проведенные в разных странах исследования по изучению распространенности *H.pylori*-инфекции показывают зависимость инфицированности от уровня социально-экономического развития страны, соблюдения санитарно-гигиенических норм, наличия достаточных бытовых удобств населения. В США и Западной Европе *H.pylori* инфицированы 30-40% населения, в странах Восточной Европы 40-70% населения [2].

Консенсус Маастрихт-3 принял основные положения по вопросам диагностики инфекции и проведения эрадикационной терапии с применением антибиотиков [3]. В настоящее время наиболее эффективным препаратом, применяемым для лечения инфекции *H.pylori* является кларитромицин – полусинтетический 14-членный макролид, производное эритромицина

А, разработанный фармацевтической компанией Taisho (Япония) в 1991 году.

Согласно рекомендациям Маастрихт-3 использование кларитромицина как базового препарата терапии первого выбора возможно при 15-20% устойчивости к нему в популяции [3,4]. Резистентность *H.pylori* к макролидам возникает в результате нуклеотидных замен в участках связывания антибиотика с большой субъединицей бактериальной рибосомы [5]. *H.pylori* содержит две копии 23S pРНК-гена, и мутации, как правило, содержатся в обеих, однако предполагается наличие мутаций и в одной из копий [6]. Чаще такие мутации связаны с низким уровнем резистентности к кларитромицину. Мутации в одной из копий 23S pРНК могут быть легко переданы другим копиям за счет рекомбинации ДНК, придавая высокий уровень устойчивости к кларитромицину. 2142G и 2142C мутантные генотипы характеризуются высоким уровнем перекрестной резистентности ко всем

макролидам, в то время как мутантный генотип T2143G связан с высоким уровнем резистентности к эритромицину [7]. Применительно к *H. pylori* известен также механизм модификации мишени для макролидов, характеризующийся снижением сродства к антибиотикам в результате мутации T2717C. При таком механизме формируется клинически значимая устойчивость и также наблюдается перекрестная резистентность ко всем макролидам [8]. В настоящее время описано более 20 точечных мутаций, обуславливающих резистентность к кларитромицину [9]. Устойчивость к кларитромицину в США и Японии – около 13%. В европейских странах резистентность к кларитромицину составляет в странах Северной Европы 4,4%, Центральной Европы 8,7% и Южной Европы 24% [10]. Последние проведенные в России исследования показали, что уровень устойчивости к кларитромицину выделенных штаммов *H. pylori* среди детей Санкт-Петербурга составил 22-28%, а резистентность к кларитромицину среди взрослых приближается к 40% [11].

Для определения устойчивости к антибиотикам разработаны как микробиологические методы, так и молекулярно-генетические, основанные на выявлении мутантных генотипов *H. pylori*. Микробиологические методы определения чувствительности и устойчивости к препаратам, такие как метод диффузии в агаре, диско-диффузионный метод и E-тесты используются большинством лабораторий, однако не получили широкого распространения из-за имеющихся трудностей, связанных с выделением *H. pylori* в чистой культуре. Длительность микробиологического исследования составляет 6-10 дней и данные, полученные в различных лабораториях, в 5-10% случаев трудно сопоставимы из-за отсутствия стандартизации метода. В то же время, воспроизводимость методов и достоверность получаемых результатов уступает молекулярно-генетическим методам [4]. Поскольку резистентность *H. pylori* к антибиотикам связана с образованием специфических мутаций, молекулярно-

генетические методы, основывающиеся на их выявлении, представляют собой привлекательную альтернативу обычным культуральным методам. Молекулярные методы не зависят от жизнеспособности клеток или темпа роста бактерий, а, следовательно, более последовательны и воспроизводимы. Кроме того, использование молекулярно-генетических методов позволяет получить быстрый результат при исследовании различного биологического материала, в том числе биоптатов слизистой оболочки желудка (СОЖ). Многочисленные молекулярно-генетические методы определения устойчивости *H. pylori* к кларитромицину и другим антибиотикам основаны на использовании полимеразной цепной реакции (ПЦР). Проведенный анализ описанных в литературе методов выявления одиночных нуклеотидных полиморфизмов и имеющийся опыт работы позволил нам провести тестирование мутантных генотипов *H. pylori* 2142G, 2143G, 2182C методом полимеразной цепной реакции с последующим определением длины рестрикционных фрагментов (ПЦР-ПДРФ) [12].

Полиморфизм длины рестрикционных фрагментов является простым методом, основанным на последующем расщеплении ампликона соответствующей рестриктазой. Благодаря простоте и надёжности метод получил широкое распространение и до сих пор популярен, хотя и имеет некоторые ограничения: во-первых, он позволяет детектировать только SNPs, расположенные в сайтах рестрикции, а во-вторых, годится лишь для детекции уже известных мутаций [13].

Цель исследования. Используя методы молекулярной диагностики, а именно ПЦР-ПДРФ, определить распространенность точечных мутаций A2142G, A2143G, T2182C формирующих резистентность к кларитромицину в Беларуси.

Материалы и методы исследования

В качестве материала для исследования использовались биоптаты СОЖ 145 пациентов Витебской и Гомельской областей с

заболеваниями желудочно-кишечного тракта и не проходивших ранее курс эрадикационной терапии с применением кларитромицина. Взятие биоптатов СОЖ осуществляли во время фиброэзофагогастроуденоскопии с прицельной биопсией слизистой оболочки антрального отдела и тела желудка. Полученный биологический материал (кусочки ткани объемом не более 5 мм) вносили в стерильные полипропиленовые пробирки объемом 1,5 мл типа «Eppendorf», содержащие 200 мкл стерильного физиологического раствора. Пробирки с пробами плотно закрывали, маркировали и транспортировали в лабораторию. При невозможности немедленной доставки проб их сохраняли в холодильнике при температуре 2-8°C в течение 3-х суток [14]. Выделение ДНК из биоптатов СОЖ проводили, используя коммерческий набор реагентов «Genomic DNA Purification Kit» (Fermentas, Литва).

Выявление ДНК *H.pylori* проводили с использованием коммерческой ПЦР-тест-системы производства ЦНИИ Эпидемиологии МЗ РФ «АмплиСенс *H.pylori* 100-R» для амплификации участка ДНК длиной 520 н.п. 16S- рибосомального гена.

Исследование полиморфизма 23S rRNA *H.pylori* проводили при помощи праймеров, синтезированных по нашему заказу ОДО «Праймтех», г. Минск, Беларусь: HP-V3 - 5'-GTCCGGTTAAATACCGACCTG-3' и HP-V2 - 5'-TGTGTAGCTACCCAGCGATGCTC-3'. Последовательность праймеров была взята нами из открытого источника [15].

Реакционная смесь состояла из 2,5-кратного ПЦР-буфера (ксиленцианол, 7,5 mM MgCl₂, Tag-полимераза) смеси нуклеотидов дНТФ 10 mM, смеси праймеров (V3-F, V2-R) 5 Мм и деионизованной воды. Объем реакционной смеси составлял 50 мкл, количество исходной ДНК с концентрацией 20 нг/мкл ДНК – 2 мкл. Амплификацию проводили в амплификаторе Palm Cycler фирмы Corbett Research (Австралия).

Программа амплификации была представлена следующим температурным режимом: 1 цикл – 95°C в течение 3 минут; 35 циклов – 95°C в течение 30 секунд; 65°C

в течение 30 секунд; 72°C в течение 30 секунд; и конечной элонгации 72°C в течение 1 минуты. 10-мкл полученного ПЦР-продукта были проанализированы электрофорезом в 1,7% агарозном геле в трис-ЭДТА-боратном (ТВЕ) буфере с окраской бромидом этидия. Для визуализации и анализа полученных результатов использовали видеосистему фирмы GelDoc XR с программой Quaniti One фирмы Bio-Rad. В качестве контроля использовали маркер молекулярного веса GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder (Fermentas, Литва). В результате выявлялся амплифицированный ПЦР-продукт размером 783 нуклеотидные пары.

Далее проводили анализ с помощью рестриктаз *Eco* 3II (*Bsa*I), *Mbo*II (Fermentas, Литва). Для проведения рестрикции было отобрано по 10 мкл ПЦР - продукта для каждой из рестриктаз и проведена инкубация при 37°C в течение 3 часов с 5 единицами *Mbo*II для обнаружения мутации A2142C/G и 5 единицами *Bsa*I для обнаружения мутации A2143G. Рестрикция эндонуклеазой *Mbo*II соответствовала двум фрагментам 670 и 112 нуклеотидных пар в присутствии мутации в положении A2142C/G и единственному фрагменту, соответствующему размеру продукта ПЦР 783 нуклеотидные пары в случае аллеля дикого типа. Рестрикция *Bsa*I соответствовала двум фрагментам 671 и 113 нуклеотидных пар при наличии мутации A2143G и единственному фрагменту 783 нуклеотидные пары в отсутствие мутации. Электрофоретическую детекцию фрагментов рестрикции проводили в 2% агарозном геле.

Анализ литературных данных по выявлению точечной мутации T2182C не показал подобранных для ее выявления праймеров или возможности выявления ее при помощи рестрикционного анализа. Все работы, связанные с изучением данной точечной мутации, основывались на анализе ДНК методом секвенирования. Метод секвенирования хотя и является «золотым» стандартом выявления мутационных изменений, из-за высокой стоимости исследования и необходимости наличия особо высококвалифици-

рованных сотрудников применяется только с исследовательской целью.

С учетом анализа данных и имеющегося опыта работы праймеры для рестрикционного анализа были подобраны нами самостоятельно исходя из известной последовательности 23S рРНК *H.pylori* GenBank U27270 и полученной методом секвенирования последовательности, содержащей мутацию T2182C. Нами была разработана структура праймеров, позволяющих искусственно (мисматч-праймеры) получать нуклеотидные последовательности со структурой, отличающейся от исходного образца. В данном случае, была построена структура праймера, создающего сайт рестрикции для эндонуклеазы *MspI* (CCGG) в случае наличия мутации T2182C.

Для выявления точечной мутации T2182C была подобрана реакционная смесь и составлена программа амплификации. Амплификацию проводили в амплификаторе Palm Cycler фирмы Corbett Research (Австралия).

Программа амплификации состояла из 1 цикла 94°C в течение 3 минут; 10 циклов 94°C в течение 15 секунд; 55°C в течение 15 секунд; 72°C в течение 15 секунд; 30 циклов 86°C в течение 17 секунд; 57°C в течение 15 секунд; 72°C в течение 15 секунд и конечной элонгации 72°C в течение 1 минуты.

Проведенный ПЦР-анализ с разработанными праймерами показал наличие одной основной зоны амплификации, размером 105 н.п. На втором этапе, ампликоны подвергались рестрикции в течение 30 минут с рестриктазой *MspI* (5 единиц). По окончании рестрикции продукты рестрикции подвергались электрофорезу в 2,5% агарозном геле в течение 1,5 часов и последующей окраской бромидом этидия. Учет результатов проводили, как описано выше.

Мутантные генотипы 2182C были представлены 2 фракциями (≈ 85 и 20 н.п.), аллель дикого типа не подвергался рестрикции – одна зона 105 н.п. В случае препаратов ДНК плохого качества на фореграммах присутствовала минорная фракция в области ≈ 85 н.п., мешающая опреде-

лению генотипа *H.pylori*. В данном случае, определение генотипа основывалось не на присутствии зоны ≈ 85 н.п., а отсутствие после рестрикции зоны 105 н.п.

Результаты исследования

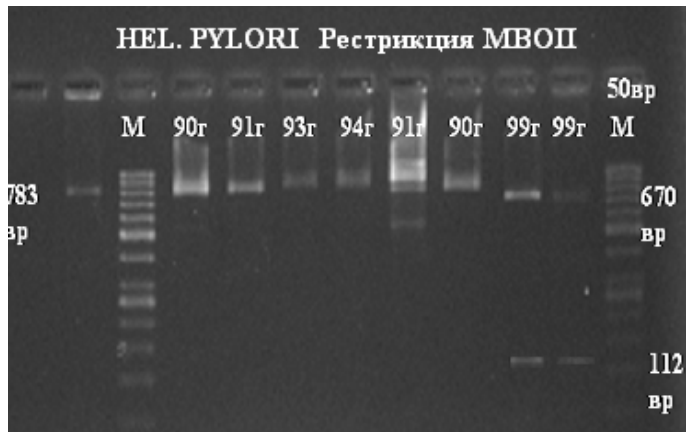
Анализ, проведенный при помощи эндонуклеазы *BsaI*, показал присутствие продуктов рестрикции размером 671 и 113 н.п. в 2-х из 145 исследуемых препаратов ДНК, что соответствовало выявлению точечной мутации A2143G (1,38%). Определяемые при помощи эндонуклеазы *MboII* мутации A2142G/C на электрофореграмме выявлялись в виде двух фрагментов размером 670 и 112 н.п. Данный тип мутаций в нашей работе был определен только в 1-ом из исследуемых образцов (0,69%). На рисунках 1-3 представлены результаты электрофоретической детекции мутантных генотипов 2142G/C, 2143G, 2182C.

Разработанная нами структура праймеров и анализ при помощи эндонуклеазы *MspI* позволили выявить точечную мутацию T2182C в 5-ти исследуемых образцах (3,44%).

Таким образом, из 145 исследуемых препаратов ДНК 8 (5,5%) обладали устойчивостью к кларитромицину. В значительной степени устойчивость к кларитромицину в Беларуси обусловлена присутствием точечной мутации T2182C. Данная мутация присутствует в 62,5% резистентных штаммов и именно ее присутствие в большинстве случаев объясняет неэффективность эрадикационной терапии. Разработанная нами методика с использованием ПЦР-ПДРФ как метода лабораторной диагностики, позволяет детектировать мутантный генотип 2182C не прибегая к такому сложному и дорогостоящему методу диагностики, как секвенирование. Это в свою очередь даст возможность выявлять и контролировать распространение резистентных к кларитромицину штаммов в Беларуси.

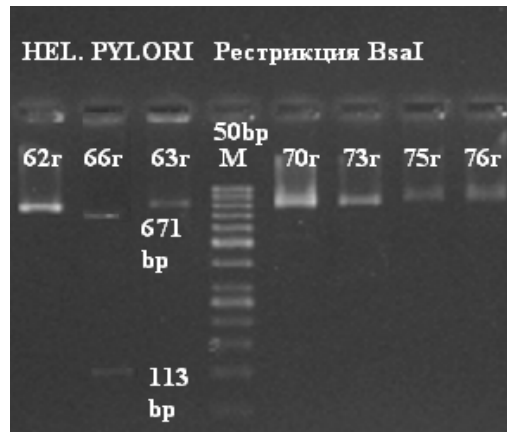
Библиографический список

1. The prevalence of *Helicobacter pylori* infection in different countries / R. Pounder



М - маркер молекулярного веса; 99г – образец с мутантным 2142G/C генотипом; 90г, 91г, 93г, 94г – образцы с нормальным генотипом

Рисунок 1 – Электрофоретический анализ выявления мутантного генотипа 2142G/C



М - маркер молекулярного веса; 66г – образец с мутантным 2143G генотипом; 62г, 63г, 70г, 73г, 75г, 76г – образцы с нормальным генотипом

Рисунок 2 – Электрофоретический анализ выявления мутантного генотипа 2143G



М - маркер молекулярного веса; 1482, 166, 237в – образцы с мутантным 2182С генотипом; 221в, 222в, 223в, 224в, 230в, 238в – образцы с нормальным генотипом

Рисунок 3 – Электрофоретический анализ выявления мутантного генотипа 2182С с использованием рестриктазы *MspI*

- [et al.] // Aliment. Pharmacol. – 1995. – Ther.9 Suppl, №2. – P. 33-39.
2. Helicobacter in the developing world / R. Frenk [et al.] // Microbes Infect. – 2003. – №5. – P. 705-713.
3. Current concepts in the management of *Helicobacter pylori* infection / P. Malfertheiner [et al.] // The Maastricht III Consensus Report. – 2007. – № 56. – 772 p.
4. *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing / F. Megraud [et al.] // Clinical Microbiology Reviews. – 2007. – Vol. 20, № 2. – P. 280-322.
5. Primary *Helicobacter pylori* resistance to metronidazole and clarithromycin in the Finnish population / T. Koivisto [et al.] // Aliment Pharmacol. – 2005. – № 9. – P. 1009-1017.
6. Mutations in 23S rRNA are associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* / J. Versalovich [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 1996. – № 40. – P. 477-480.
7. Genotypic characterization of clarithromycin-resistant and susceptible *Helicobacter pylori* strains from the same patient demonstrates existence of two unrelated isolates / G. Wang [et al.] // J. Clin. Microbiol. – 1998. – № 36. – P. 2730-2731.
8. New site of modification of 23S rRNA associated with clarithromycin resistance of *Helicobacter pylori* clinical isolates / C. Fontana [et al.] // Antimicrob Agents Chemother. – 2002. – № 46. – P. 3765–3769.
9. Саблин, О.А. Проблема резистентности *Helicobacter pylori* к кларитромицину / О.А. Саблин, Т.А. Ильчишина // Гастроэнтерология. – 2009. – № 2. – С. 4-8.
10. Prevalence and evolution of *Helicobacter pylori* resistance to 6 antibacterial agents over 12 years and correlation between susceptibility testing methods / L. Boyanova [et al.] // Diagn Microbiol Infect Dis. – 2008. – № 4. – P. 409-415.
11. Паролова, Н.И. Сравнительная оценка эффективности эрадикационной терапии инфекции *Helicobacter pylori* у детей: Автореф. дис. ... канд. мед. наук: 14.00.09 / Н.И. Паролова: – С.-Пб., 2008. – 19 с.
12. Воропаева, А.В. Молекулярно-генетическая идентификация наиболее распространенных в Беларуси генотипов *H.pylori* характеризующихся резистентностью к кларитромицину / А.В.Воропаева, Е.В. Воропаев, О.Ю.Баранов // Актуальные проблемы медицины. – 2010. – №.3. – С. 154-157.
13. Ford-Lluid, B. Measuring genetic variation using molecular markers / B. Ford-Lluid, K. Painting. – Rome: IPGRI, 1996. – 72 p.
14. Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала инфицированного патогенными биологическими агентами I-II групп патогенности: Методические указания. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, – 2004. – 38 с.
15. Detection of Clarithromycin-Resistant *Helicobacter pylori* in Stool Samples / C. Fontana [et al.] // Journal of Clinical Microbiology. – 2003. – Vol. 41. – №. 8. – P. 3636-3640.

**A. Voropaeva, E. Voropaev, O. Baranov, E. Platoshkin, A. Shafransky,
S. Pimanov, E. Makarenko**

MOLECULAR-GENETIC TESTING OF 23S RRNA *HELICOBACTER PYLORI* GENE MUTATIONS DEFINING RESISTANCE TO CLARITHROMYCIN IN BELARUS

The definition of appearance frequency of point mutations forming resistance to clarithromycin in Belarus was performed by PCR-RFLP method. 145 persons were examined with proved infection of *H.pylori*. Within the restriction analysis of 23S rRNA *H.pylori* gene fragment the point mutations of T2182C (3,44%), A2142G/C (0,69%) and A2143G (1,38%) were detected. Thus, the point mutations forming resistance to clarithromycin were found in 5,5% of the examined patients. To a considerable degree the resistance to clarithromycin in Belarus is caused by presence of T2182C (62,5%) point mutation. Application of PCR-RFLP in laboratory diagnostics gives the opportunity to diagnose dominating mutant genotypes forming clarithromycin-resistant *H.pylori*.

Key words: *H.pylori*, clarithromycin, PCR-RFLP, point mutation, resistance

Поступила 06.04.10