

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

¹ГУ «РНПЦрадиационной 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 рРНК-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 рРНК 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 2143G 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 фиброэзофагогастродуоденоскопии 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 (ксиленианол, 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 QuantiT 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 (BsaI)*, *MboII* (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 *MboII* для обнаружения мутации A2142C/G и 5 единицами *BsaI* для обнаружения мутации A2143G. Рестрикция эндонуклеазой *MboII* 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 *BsaI* 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 U27200 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

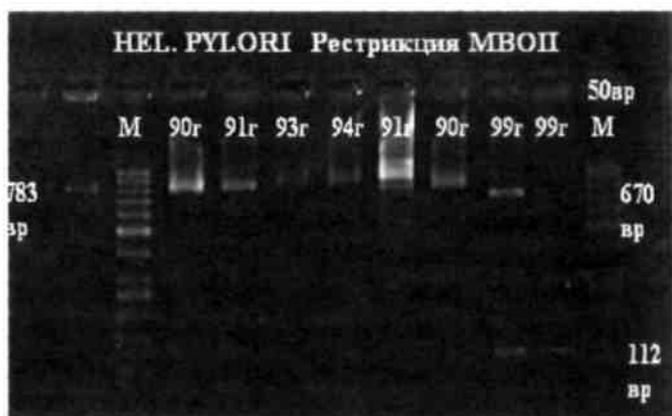
Анализ, проведенный при помощи эндонуклеазы *BsaI*, показал присутствие продуктов рестрикции размером 671 и 113 н.п. в 2-х из 145 исследуемых препаратов ДНК, что соответствовало выявлению точечной мутации A2143G (1,38%). Определяемые при помощи эндонуклеазы *MboII* мутации A2142G/C на электрофореграмме 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-ПДФ 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.

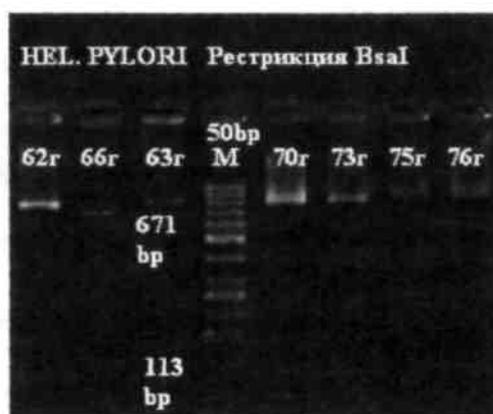
Библиографический список

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 2182C генотипом; 221в, 222в, 223в, 224в, 230в, 238в – образцы с нормальным генотипом

Рисунок 3 – Электрофоретический анализ выявления мутантного генотипа 2182C 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. - 772p.
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-Lloud, B. Measuring genetic variation using molecular markers / B. Ford-Lloud, 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