

УДК 616.33-07:[616.98:579.835.12]:615.015.8

<https://doi.org/10.51523/2708-6011.2023-20-4-19>

Определение первичной резистентности *Helicobacter pylori* к левофлоксацину в образцах биоптатов слизистой оболочки желудка с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени

А. В. Воропаева, Н. И. Шевченко

Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека, г. Гомель, Беларусь

Резюме

Цель исследования. Изучить первичную резистентность *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) к левофлоксацину у жителей Гомельской области методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР РВ).

Материалы и методы. В исследование включено 170 пациентов с диагнозом «Гастрит и дуоденит», К29, медиана возраста — 48,5 года (25 и 75 % — 37 и 61 год). Согласно анкетным данным пациентов, эрадикационная терапия с применением левофлоксацина им не проводилась. Для определения резистентности *H. pylori* к левофлоксацину использовали метод ПЦР РВ.

Результаты. Из 170 исследуемых образцов ДНК 8 образцов имели сомнительный результат и согласно методике учета результатов подлежат перестановке с этапа выделения ДНК. Остальные 162 образца являлись положительными по гену β -актин (внутренний контрольный образец — ВКО) и учитывались при дальнейшем анализе (Ct, CY5 19,6–27,4). ДНК гена *16sRNA* (Ct, ROX 19,5–30,04), свидетельствующая об инфицировании бактерией, подтверждена в 152 образцах (93,8 %). ДНК гена *gyrA* (точечные мутации A259T, T261C, G261A, G271A, G271T и A272G) выявлена в 19 из 152 образцов ДНК, и резистентность *H. pylori* к левофлоксацину составила 12,5 %, (Ct, Hex 23,2–30,7). Заведомо положительные контрольные пробы имели характерный рост кривых по соответствующим каналам детекции, в заведомо отрицательных — рост кривых не отмечен.

Заключение. Первичная резистентность *H. pylori* к левофлоксацину у жителей Гомельской области составила 12,5 %. Мутации гена *gyrA* являются наиболее чувствительным маркером для прогнозирования успешной эрадикации при использовании фторхинолонов, в частности левофлоксацина. ПЦР РВ является надежным методом выявления мутаций и позволяет проводить одновременное выявление ДНК *H. pylori* и резистентности к левофлоксацину, что значительно сокращает время исследования.

Ключевые слова: *H. pylori*, праймеры, полимеразная цепная реакция в реальном времени, левофлоксацин, резистентность

Вклад авторов. Воропаева А.В.: идея, концепция, планирование и выполнение исследования, анализ и обработка материала и его изложение, библиография; Шевченко Н.И.: анализ материала, общее редактирование.

Конфликт интересов. Нет.

Источник финансирования. Исследование выполнено в рамках задания 3.12 «Изучить молекулярно-генетические факторы устойчивости *H. pylori* к противомикробным лекарственным средствам для оптимизации метода эрадикации» 2019–2021 гг., подпрограмма 4.2 «Фундаментальные аспекты медицинской науки», ГПНИ 4 «Трансляционная медицина».

Для цитирования: Воропаева А.В., Шевченко Н.И. Определение первичной резистентности *Helicobacter pylori* к левофлоксацину в образцах биоптатов слизистой оболочки желудка с использованием полимеразной цепной реакции в реальном времени. Проблемы здоровья и экологии. 2023;20(4):149–154. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2023-20-4-19>

Determination of *Helicobacter pylori* primary resistance to levofloxacin in gastric mucosal biopsy samples using real-time polymerase chain reaction

Alla V. Voropaeva, Natalia I. Shevchenko

Republican Scientific and Practical Center for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Belarus

Abstract

Objective. To study the primary resistance of *Helicobacter pylori* (*H. pylori*) to levofloxacin in residents of Gomel region by real-time polymerase chain reaction (RT PCR).

© А. В. Воропаева, Н. И. Шевченко, 2023

Materials and methods. The study included 170 patients diagnosed with gastritis and duodenitis, K29, median age - 48.5 years (25% and 75% - 37 and 61 years). According to the questionnaire data of the patients, eradication therapy with levofloxacin was not performed for them. To determine the resistance of *H. pylori* to levofloxacin we used RT PCR.

Results. Out of 170 DNA samples analyzed, 8 samples had doubtful results and according to the methodology for recording the results are subject to rearrangement from the DNA isolation stage. The remaining 162 samples were positive for the β -actin gene (internal control sample - ICS) and were taken into account in further analysis (Ct, CY5 19.6-27.4). 16sRNA gene DNA (Ct, ROX 19.5-30.04), indicative of bacterial infection, was confirmed in 152 samples (93.8%). DNA of the *gyrA* gene (point mutations A259T, T261C, G261A, G271A, G271T and A272G) was detected in 19 of 152 DNA samples, and *H. pylori* resistance to levofloxacin was 12.5 %, (Ct, Hex 23.2-30.7). The positive control samples had characteristic curve growth on the corresponding detection channels, while the negative samples showed no curve growth.

Conclusion. Primary resistance of *H. pylori* to levofloxacin in residents of Gomel region amounted to 12.5%. Mutations of *gyrA* gene are the most sensitive marker for predicting successful eradication when using fluoroquinolones, in particular levofloxacin. RT PCR is a reliable method of mutation detection and allows simultaneous detection of *H. pylori* DNA and resistance to levofloxacin, which significantly reduces the study time.

Keywords: *H. pylori*, primers, real-time polymerase chain reaction, levofloxacin, primary resistance

Author contributions. Voropaeva A.V.: Idea, concept, planning and execution of the study, analysis and processing of the material and its presentation, bibliography. Authors' contribution. Shevchenko N.I.: Analysis of the material, general editing.

Conflict of interest. None.

Funding. The study was performed within the framework of task 3.12 "Study molecular genetic factors of *H. pylori* resistance to antimicrobial drugs to optimize the eradication method" 2019-2021, subprogram 4.2 "Fundamental aspects of medical science", State Program of Scientific Research 4 "Translational medicine".

For citation: Voropaeva AV, Shevchenko NI. Determination of *Helicobacter pylori* primary resistance to levofloxacin in gastric mucosa biopsy samples using real-time polymerase chain reaction. *Health and Ecology Issues*. 2023;20(4):149–154. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2023-20-4-19>

Введение

Чувствительность *H. pylori* к антибиотикам является главным условием успешности эрадикационной терапии. Эрадикация *H. pylori* включает стандартную тройную терапию на основе ингибитора протонной помпы (ИПП), кларитромицина и амоксициллина или метронидазола в качестве терапии первой линии, а при неудачном применении терапии кларитромицином рекомендуется либо четырехкомпонентная терапия на основе препаратов висмута, либо терапия на основе левофлоксацина [1, 2]. Тройная терапия, ИПП + кларитромицин + амоксициллин или метронидазол, без предварительного тестирования чувствительности неэффективна, если уровень резистентности к кларитромицину в регионе превышает 15 %. Схемами эмпирического выбора второй линии (когда тест на чувствительность к антибактериальным препаратам недоступен) являются фторхинолон-содержащая квадротерапия (ИПП + левофлоксацин + амоксициллин + висмут) или фторхинолон-содержащая тройная терапия (ИПП + левофлоксацин + амоксициллин), а также висмут-содержащая квадротерапия [2]. Фторхинолон-содержащая тройная терапия превосходит по эффективности 7-дневную тройную терапию с кларитромицином (ОШ: 4,29, 95 % ДИ: 1,67–12,12), в том числе превышающая висмут-содержащую квадротерапию (ОШ:

2,25, 95 % ДИ: 1,10–4,62) [3]. Устойчивость к левофлоксацину снизила вероятность успеха схем лечения, содержащих левофлоксацин, в среднем на 20–40 % [4]. Устойчивость к хинолонам легко приобретает, и уровень резистентности зависит от уровня потребления этих препаратов. Последние проведенные метаанализы показали, что первичная устойчивость к левофлоксацину в США находится на уровне 37,6 % (95 % ДИ: 26,3–50,4), в Китае — 35 % (95 % ДИ: 30–40), в России — 20 % (95 % ДИ: 12,6–28,6) [5, 6, 7]. Хинолоны (левофлоксацин, цiproфлоксацин и др.) проявляют свою антимикробную активность, ингибируя фермент ДНК-гиразу (топоизомеразу II) на уровне субъединицы А ДНК-гиразы. *H. pylori* не имеет гена, кодирующего топоизомеразу IV, важную мишень для хинолонов других бактерий. ДНК-гираза обеспечивает релаксацию суперскрученных петель кольцевой хромосомы бактерий, формируемых полимеразными комплексами во время репликации и транскрипции. Блокировка ДНК-гиразы останавливает полимеразный комплекс, накопившиеся участки суперскрученности мешают разделению дочерних кольцевых геномов, и бактерия погибает из-за нарушений в цитоплазме, клеточной стенке и мембранах. Фермент ДНК-гираза представляет собой тетрамер, состоящий из двух субъединиц А и двух субъединиц В, кодируемых генами *gyrA* и *gyrB* соответ-

ственно. Основную роль в устойчивости *H. pylori* к хинолонам играет область (QRDR — Quinolone Resistance Determining Region) гена *gyrA*, в определенных регионах которой образуются мутации, ответственные за резистентность к левофлоксацину [8]. Устойчивость к левофлоксацину в основном связана с вариантами гена *gyrA* A259T и T/C 261G/A кодона N87 и вариантами G271A, G271T и A272G кодона D91 [9, 10]. Данные мутации обеспечивают высокий уровень устойчивости к фторхинолонам [11]. Применение классического микробиологического теста в клинической практике трудно выполнимо ввиду особенностей культивирования *H. pylori*, и успешность культивирования невысока даже в специализированных лабораториях. Молекулярные методы созданы с учетом признанных мутаций и представляют собой независимый альтернативный метод тестирования резистентности без использования культур бактерий [2, 12].

Цель исследования

Изучить первичную резистентность *H. pylori* к левофлоксацину жителей Гомельской области методом ПЦР РВ.

Материалы и методы

В исследование включено 170 пациентов с диагнозом «Гастрит и дуоденит», K29, медиана возраста — 48,5 года (25 и 75 % — 37 и 61 год). Согласно анкетным данным пациентов, эради-

кационная терапия *H. pylori* с применением левофлоксацина им не проводилась. Полученный биологический материал (кусочки ткани объемом не более 5 мм³) вносили в пробирки объемом 1,5 мл типа «Eppendorf», содержащие 200 мкл стерильного физиологического раствора и транспортировали в лабораторию. При невозможности немедленной доставки проб их сохраняли в холодильнике при температуре +2...+8 °С в течение трех суток [13]. Далее проводили выделение тотальной ДНК по разработанной методике с применением протеиназы К. С этой целью рекомендуемый производителем протокол выделения ДНК комплекта реагентов «ПРОБА–НК» (производства ООО «НПО ДНК-Технология», Россия) дополняется предварительным этапом лизиса биоптата желудка раствором, содержащим протеиназу К (20 мг/мл), при температуре 56 °С в течение 1–2 ч. После проведения выделения количество ДНК определяли фотометрически; препараты ДНК, отвечающие стандартным требованиям, использовали для проведения ПЦР РВ. Дизайн исследования включал выявление в образце ДНК непосредственно *H. pylori* (*16s rRNA*), определение 6 основных мутаций гена *gyrA*, определение ВКО (β-актин). Для выполнения исследования использовались синтезированные по нашему заказу праймеры и флуоресцентные зонды (таблица 1), а также премикс ArtMix ДНК полимеразы 2х, производства ООО «АртБиоТех», Республика Беларусь.

Таблица 1. Праймеры и зонды для ПЦР РВ [14]
Table 1. Primers and probes for real-time PCR

Наименование гена	Наименование праймера и зонда, последовательность (5'-3')
16s rRNA	HP -5'-CCCATCAGGAAACATCGCTTCA -3' HP-R 5'-TCCAATATGCTGGAGAATTGGCTA -3' HP-P-5'-TGCTTGCCACGCCATCCATCACATCA-3' 5'ROX, 3'BHQ1
<i>gyrA</i>	259 F-5'-CACCCCATGGCGGTT -3', 261G F- 5'-CCCCATGGCGATACG-3', 261A F- 5'-CCCCATGGCGATACA-3', 271A F -5'-CATGGCGATAATGCGGTTTGTA-3', 271T F-5'-CATGGCGATAATGCGGTTTGTT-3', 272G F -5'- ACCCCCATGGCGATAATGCGGTTTATCG -3', <i>gyrA</i> HP-F-R -5'-ACTCGCCTTAGTCATTC-3', <i>gyrA</i> HP-F-P 5'--CGTTATCGCCATCAATAGAGCCAA -3', 5'HEX, 3'BHQ2
β-актин	ACTIN F -5'-CCCATCTACGAGGGCTACGC-3', ACTIN R-5'- GGATCTTCATGAGGTAGTCGGTCAG-3', ACTIN P-5'-CCATCCTGCGTCTGGACCTGGCTGGC-3', 5'CY5,3'BHQ

Смесь реагентов для проведения одной реакции в объеме 25 мкл формировали следующим образом: ArtMix ДНК полимеразы 2х смесь

премикс — 12,5 мкл, 6 прямых праймеров для определения резистентности к левофлоксацину (10 пмоль) — по 0,2 мкл каждого, обратный

праймер для определения резистентности к левофлоксацину (10 пмоль) — 2,0 мкл, флуоресцентный зонд для определения резистентности к левофлоксацину (10 пмоль) — 0,7 мкл; прямой и обратный праймеры для определения β -актина (10 пмоль) — по 0,2 мкл каждого, флуоресцентный зонд для определения β -актина (10 пмоль) — 0,7 мкл; прямой и обратный праймеры для определения *16s rRNA H. pylori* (10 пмоль) — по 0,2 мкл каждого, флуоресцентный зонд для определения *16s rRNA H. pylori* (10 пмоль) — 0,7 мкл; вода — 1,4 мкл, образец ДНК — 5 мкл. Программа амплификации включала: 95 °C — 2 минуты (1 цикл); 95 °C — 15 с, 58 °C — 45 с (40 циклов) → считывание сигнала в конце каждого цикла [14].

Дополнительно в постановку включали ОКО (отрицательный контрольный образец, дистиллированная вода), предназначенный для выявления артефактов в ходе реакции и постановку NTC (холостой пробы). Также в постановку включали ПКО (заведомо положительный образец по каждому из определяемых генов). Анализ результатов проводили по каждому из образцов, согласно рассчитанным программой пороговым линиям для всех кривых амплификации по соответствующему каналу флуоресцентной детекции и визуально, амплификатор CFX 96 C1000 Touch (BioRad, США). Пороговую линию устанавливали в диапазоне 50–250 RFU (relative fluorescence units). Образец считали положительным, если в таблице результатов пороговых циклов по детектируемым каналам определено значение *Ct* (cycle threshold) и кривая флуоресценции данного образца пересекает пороговую линию на участке характерного экспоненциального подъема флуоресценции.

Полученные результаты интерпретировали следующим образом:

- Наличие характерной кривой по каналу детекции CY5 — выявлен фрагмент гена β -актина (ВКО), образец подлежит дальнейшему анализу.
- Наличие характерной кривой по каналу детекции ROX — выявлена *H. pylori*.
- Наличие характерной кривой по каналу детекции HEX — выявлена резистентность к левофлоксацину.

• Наличие характерных кривых хотя бы по одному из детектируемых каналов (HEX, ROX, CY5) в образцах ОКО и NTC свидетельствует о загрязнении реакционной смеси или расходных материалов (ложноположительные образцы).

Отсутствию характерного роста кривой по каналу CY5 (ВКО) свидетельствует об ингибировании ПЦР (ложноотрицательные образцы).

- Положительными считали образцы при значении *Ct* < 31, значения *Ct* 31–35 считали со-

мнительными и подлежащими перестановке с этапа выделения ДНК.

Статистический анализ. Результаты представлены в виде частоты выявления конкретного гена (в процентах).

Результаты и обсуждение

При анализе кривых флуоресценции установлены 2 сомнительных образца для гена β -актин, 5 — для *16s rRNA* и 1 — для *gyrA*, данные 8 образцов ДНК не учитывались при дальнейшем анализе. Заведомо положительные контрольные пробы имели характерный рост кривых по соответствующим каналам детекции, в заведомо отрицательных — рост кривых не отмечен. Все остальные 162 образца ДНК являлись положительными по гену β -актин (ВКО) и учитывались при дальнейшем анализе (*Ct*, CY5 19,6–27,4). ДНК гена *16sRNA* (*Ct*, ROX 19,5–30,04), свидетельствующая об инфицировании бактерией, подтверждена в 152 образцах (93,8 %). ДНК гена *gyrA* (точечные мутации A259T, T261C, G261A, G271A, G271T и A272G) выявлена в 19 из 152 образцов ДНК, и резистентность *H. pylori* к левофлоксацину составила 12,5 % (*Ct*, Hex 23,2–30,7) (рисунок 1).

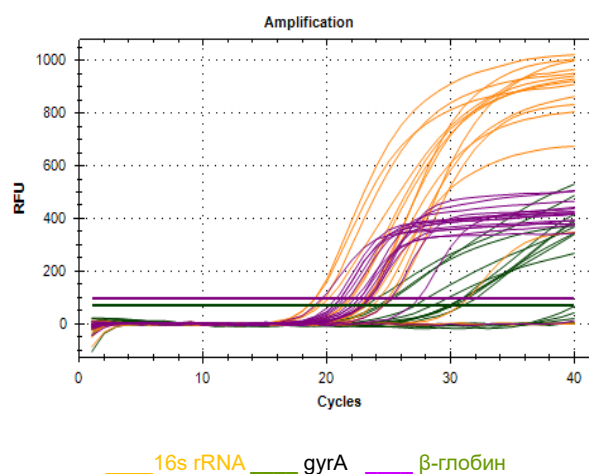


Рисунок 1. Кинетические кривые анализа гена *16s rRNA*, *gyrA* и β -глобина

Figure 1. Kinetic curves of *16s rRNA*, *gyrA* and β -globin gene analysis

Рост устойчивости *H. pylori* к противомикробным препаратам является настолько тревожным, что в 2018 г. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) включила *H. pylori* в список высокоприоритетных микроорганизмов для разработки новых антибиотиков. Согласно данным ВОЗ, в мире общая резистентность к левофлоксацину составляет 24 %, причем резистентность к левофлоксацину в Европейском регионе — 11 %,

Юго-Восточной Азии — 30 %, Америке — 15 %, странах Восточного Средиземноморья — 19 %, Африке — 14 %, Западной части Тихого океана — 22 % [15, 16]. Инфекция *H. pylori* является не только самой распространенной инфекцией во всем мире, но и канцерогеном 1-й группы. У 20 % пациентов с симптоматической инфекцией это связано со значительной заболеваемостью и смертностью. Несмотря на достижения в тестировании на чувствительность, а также на то, что принципы разумного использования антибиотиков должны применяться к инфекции *H. pylori*, лечение данной инфекции для большинства пациентов остается эмпирическим. Для эффективного лечения схему антибиотиков следует выбирать с учетом данных о региональных и национальных показателях резистентности и успешности лечения *H. pylori*. Высокие показатели резистентности к кларитромицину и левофлоксацину (> 30 %) несовместимы с их применением с ИПП и амоксициллином в стандартных схемах тройной терапии, для эффективного лечения уровень резистентности не должен превышать 15 % [17]. Мутации гена *gyrA* являются наиболее чувствительным маркером для прогнозирования успешной эрадикации при использовании терапии, содержащей хинолоны. Следует отметить, что ПЦР, и особенно ПЦР РВ, — быстрый, в срав-

нении с культуральным методом, однако ограничен идентификацией известных мутаций в генах резистентности.

Заключение

Первичная резистентность к левофлоксацину жителей Гомельской области составляет 12,5 %, что обосновывает применение данного антибиотика при эрадикации *H. pylori*. Использование ПЦР РВ позволяет назначать индивидуальную эрадикационную терапию, основанную на выборе антибиотиков, что, в свою очередь, улучшит качество лечения и снизит резистентность *H. pylori*. В настоящее время молекулярное тестирование можно проводить с использованием секвенирования нового поколения (NGS), биологическим материалом служат биопсии слизистой желудка, в том числе фиксированные в формалине и залитые в парафин, и образцы кала [18]. Время выполнения методики — от 24 до 72 ч. Оценка результатов основана на знаниях о молекулярных основах фенотипической резистентности к 6 наиболее часто назначаемым в схемах лечения *H. pylori* антибиотикам: кларитромицину, амоксициллину, тетрациклину, метронидазолу, рифабутину и левофлоксацину.

Список литературы / References

1. Диагностика и лечение пациентов с заболеваниями органов пищеварения [Электронный ресурс]: клинический протокол: постановление Министерства здравоохранения Респ. Беларусь, 01 июня 2017 г., № 54, прил. 2. [дата обращения 2023 ноябрь 01]. Режим доступа: <https://pravo.by/document/?guid=12551&p0=W21732115p&p1=1>
2. Diagnosis and treatment of patients with diseases of the digestive system: clinical protocol [Electronic resource]: resolution of the Ministry of Health of the Republic of Belarus, June 01, 2017, No. 54, App. 2. [date of access 2023 Nov 01]. Available from: <https://pravo.by/document/?guid=12551&p0=W21732115p&p1=1>
3. Malfertheiner P, Megraud F, Rokkas T, Gisbert JP, Liou JM, Schulz C, Management of Helicobacter pylori infection: the Maastricht VI/Florence consensus report. *Gut*. 2022 Aug 8; [gutjnl-2022-327745](https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-327745). DOI: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-327745>
4. Yeo YH, Hsu CC, Lee CC, Ho HJ, Lin JT, Wu MS, et al. Taiwan Gastrointestinal Disease and Helicobacter Consortium. Systematic review and network meta-analysis: Comparative effectiveness of therapies for second-line Helicobacter pylori eradication. *J Gastroenterol Hepatol*. 2019 Jan;34(1):59-67. DOI: <https://doi.org/10.1111/jgh.14462>
5. Fischbach L, Evans EL. Meta-analysis: the effect of antibiotic resistance status on the efficacy of triple and quadruple first-line therapies for Helicobacter pylori. *Aliment Pharmacol Ther*. 2007 Aug 1;26(3):343-357. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2036.2007.03386.x>
6. Chen J, Li P, Huang Y, Guo Y, Ding Z, Lu H. Primary Antibiotic Resistance of *Helicobacter pylori* in Different Regions of China: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Pathogens*. 2022 Jul 12;11(7):786. DOI: <https://doi.org/10.3390/pathogens11070786>
7. Ho JJC, Navarro M, Sawyer K, Elfanagely Y, Moss SF. Helicobacter pylori Antibiotic Resistance in the United States Between 2011 and 2021: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Am J Gastroenterol*. 2022 Aug 1;117(8):1221-1230. DOI: <https://doi.org/10.14309/ajg.0000000000001828>
8. Андреев Д.Н., Маев И.В., Кучерявый Ю.А. Резистентность Helicobacter pylori в Российской Федерации: метаанализ исследований за последние 10 лет. *Терапевтический архив*. 2020;92(11):2-30. DOI: <https://doi.org/10.26442/00403660.2020.11.000795>
9. Andreev DN, Maev IV, Kucheryavyu YA. Helicobacter pylori resistance in the Russian Federation: a meta-analysis of studies over the past 10 years. *Therapeutic Archive*. 2020;92(11):24-30. DOI: <https://doi.org/10.26442/00403660.2020.11.000795>
10. Fallone CA, Moss SF, Malfertheiner P. Reconciliation of Recent Helicobacter pylori Treatment Guidelines in a Time of Increasing Resistance to Antibiotics. *Gastroenterology*. 2019 Jul;157(1):44-53. DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2019.04.011>
11. Kim SY, Chung J-W. Best Helicobacter pylori Eradication Strategy in the Era of Antibiotic Resistance. *Antibiotics*. 2020;9(8):436. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics9080436>
12. López-Gasca M, Peña J, García-Amado MA, Michelangeli F, Contreras M. Point Mutations at *gyrA* and *gyrB* Genes of Levofloxacin-Resistant Helicobacter pylori Isolates in the Esophageal Mucosa from a Venezuelan Population. *Am J Trop Med Hyg*. 2018 Apr;98(4):1051-1055. DOI: <https://doi.org/10.4269/ajtmh.17-0478>
13. Nishizawa T, Suzuki H. Mechanisms of Helicobacter pylori antibiotic resistance and molecular testing. *Front Mol Biosci*. 2014 Oct 24;1:19. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00019>

12. Guevara B, Cogdill AG. *Helicobacter pylori*: A Review of Current Diagnostic and Management Strategies. *Dig Dis Sci*. 2020 Jul;65(7):1917-1931. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10620-020-06193-7>

13. Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности [Электронный ресурс]: методические указания МУ 1.3.1794-03, МУ 1.3.1794-04. Минздрав России. 2003. – Прил. 7. [дата обращения 2023 ноябрь 01]. Режим доступа: <https://meganorm.ru/Data2/1/4293855/4293855457.htm>

Organization of work during PCR research of material contaminated with pathogenic biological agents of III-IV pathogenicity groups [Electronic resource]: methodological recommendations MU 1.3.1794-03, MU 1.3.1794-04. Ministry of Health of Russia. 2003. – App. 7. [date of access 2021 Nov 01]. Available from: <https://meganorm.ru/Data2/1/4293855/4293855457.htm>

14. Li Y, Lv T, He C, Wang H, C David S, et al. Evaluation of multiplex ARMS-PCR for detection of *Helicobacter pylori* mutations conferring resistance to clarithromycin and levofloxacin. *Gut Pathog*. 2020;12: Article 35.

DOI: <https://doi.org/10.1186/s13099-020-00373-6>

15. Savoldi A, Carrara E, Graham DY, Conti M, Tacconelli E. Prevalence of Antibiotic Resistance in *Helicobacter pylori*: A Systematic Review and Meta-analysis in World Health Organization Regions. *Gastroenterology*. 2018 Nov;155(5):1372-1382.e17.

DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.07.007>

16. Tacconelli E, Carrara E, Savoldi A, Harbarth S, Mendelson M, Monnet DL, et al. Discovery, research, and development of new antibiotics: the WHO priority list of antibiotic-resistant bacteria and tuberculosis. *Lancet Infect Dis*. 2018 Mar;18(3):318-327.

DOI: [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30753-3](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30753-3)

17. Shah SC, Iyer PG, Moss SF. AGAClinical Practice Update on the Management of Refractory *Helicobacter pylori* Infection: Expert Review. *Gastroenterology*. 2021 Apr;160(5):1831-1841.

DOI: <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.11.059>

18. Sah S, Chen L, Houghton J, Kemppainen J, Marko AC, Zeigler R, Latham GJ. Functional DNA quantification guides accurate next-generation sequencing mutation detection in formalin-fixed, paraffin-embedded tumor biopsies. *Genome Med*. 2013 Aug 30;5(8):77.

DOI: <https://doi.org/10.1186/gm481>

Информация об авторах / Information about the authors

Воропаева Алла Викторовна, к.б.н., доцент, врач клинической лабораторной диагностики, ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», Гомель, Беларусь

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0213-2421>

e-mail: allo4ka3665@mail.ru

Шевченко Наталья Ивановна, к.м.н., доцент, заведующий лабораторией клеточных технологий, ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», Гомель, Беларусь

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0579-6215>

e-mail: shevchenkoni@bk.ru

Alla V. Voropaeva, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Doctor of Clinical Laboratory Diagnostics, Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Belarus

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0213-2421>

e-mail: allo4ka3665@mail.ru

Natalia I. Shevchenko, Candidate of Medical Sciences, Associate Professor, Head of the Department of Laboratory, Republican Research Center for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Belarus.

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-0579-6215>

e-mail: shevchenkoni@bk.ru

Автор, ответственный за переписку / Corresponding author

Воропаева Алла Викторовна

e-mail: allo4ka3665@mail.ru

Alla V. Voropaeva

e-mail: allo4ka3665@mail.ru

Поступила в редакцию / Received 06.10.2023

Поступила после рецензирования / Accepted 13.11.2023

Принята к публикации / Revised 04.12.2023