



¹ Московский
клинический научно-
практический центр
им. А.С. Логинова

² Смоленский
государственный
медицинский
университет

³ Тверской
государственный
медицинский
университет

⁴ Московский
государственный
медико-
стоматологический
университет
им. А.И. Евдокимова

Возможности молекулярно-генетического метода выявления резистентности к кларитромицину и левофлоксацину у *Helicobacter pylori*

Л.А. Цапкова, к.б.н.¹, В.В. Полякова¹, Н.А. Бодунова, к.м.н.¹,
И.В. Баратова¹, И.Н. Войнован, к.м.н.¹, Н.Н. Дехнич, д.м.н.²,
Н.В. Иванчик, к.м.н.², Е.А. Сабельникова, д.м.н.^{1, 4}, Д.С. Бордин, д.м.н.^{1, 3, 4}

Адрес для переписки: Лариса Александровна Цапкова, l.capkova@mknc.ru

Для цитирования: Цапкова Л.А., Полякова В.В., Бодунова Н.А. и др. Возможности молекулярно-генетического метода выявления резистентности к кларитромицину и левофлоксацину у *Helicobacter pylori*. Эффективная фармакотерапия. 2022; 18 (42): 16–21.

DOI 10.33978/2307-3586-2022-18-42-16-21

Около половины населения земного шара инфицировано бактерией *Helicobacter pylori*, что во всех случаях ведет к развитию хронического гастрита, который может прогрессировать в язвенную болезнь, MALT-лимфому и рак желудка. Эрадикация *H. pylori* предотвращает развитие данных заболеваний. Рост устойчивости *H. pylori* к антибиотикам, особенно к кларитромицину, является основной причиной неэффективности лечения и представляет собой серьезную проблему. Консенсус Маастрихт VI предлагает две основные стратегии выбора эрадикационной терапии: индивидуализированную – на основе определения чувствительности к антибактериальным препаратам (фенотипическим или молекулярно-генетическим методом) до их назначения, и эмпирическую, с учетом данных о локальной резистентности *H. pylori* к кларитромицину и мониторинга эффективности схем в регионе. В этой связи возрастает роль молекулярно-генетических методов оценки устойчивости *H. pylori* к антибиотикам.

Цель исследования – определение чувствительности и специфичности выявления резистентности изолятов *H. pylori* к кларитромицину и левофлоксацину методом ПЦР.

Материалы и методы. Протестировано 25 образцов (изолятов) *H. pylori*, у которых уже была определена чувствительность к кларитромицину и левофлоксацину методом серийных разведений в агаре. Молекулярно-генетическое выявление резистентности проводили с помощью определения аллельных вариантов в генах, ответственных за резистентность к кларитромицину – S23 (2142A>C, 2142A>G и 2143A>G) и левофлоксацину – *gyrA* (87-й кодон 259A>T, 261T/C>G/A и 91-й кодон 271G>A, 271G>T, 272A>G).

Результаты. Установлено, что 11 образцов из 25 имели мутации в гене устойчивости к кларитромицину, в 13 образцах зарегистрированы мутации в гене устойчивости к левофлоксацину, шесть образцов имели двойную устойчивость. Все 11 культур с фенотипической устойчивостью к кларитромицину имели мутации в гене S23 рНК. Из 14 культур с фенотипической резистентностью к левофлоксацину мутации в гене *gyrA* имели 13 культур. Чувствительность и специфичность молекулярно-генетического метода определения резистентности к кларитромицину составили 100%, в отношении резистентности к левофлоксацину эти показатели составили 93 и 92% соответственно.

Заключение. Молекулярно-генетический метод позволяет быстро и точно определять устойчивость *H. pylori* к кларитромицину и левофлоксацину, способствует выбору персонализированных схем лечения пациентов с инфекцией *H. pylori*.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*, полимеразная цепная реакция, устойчивость к антибиотикам, кларитромицин, левофлоксацин



Введение

Helicobacter pylori (*H. pylori*) представляет собой грам-отрицательную бактерию, которой инфицировано около 4,4 млрд человек во всем мире. В развитых странах отмечен тренд на снижение распространенности этой инфекции, что ассоциировано со снижением заболеваемости язвенной болезнью и раком желудка [1]. В Российской Федерации распространенность *H. pylori* ранее оценивали на уровне 50–92% [2–4], а по последним данным, в России инфицировано около 40% населения [5].

Бактерия *H. pylori* является основной причиной развития хронического гастрита, язвенной болезни, рака желудка, MALT-лимфомы [6] и других заболеваний [7]. Эрадикационная терапия *H. pylori* является основным методом лечения этих заболеваний и методом первичной профилактики рака желудка [8].

В недавно опубликованном консенсусе Маастрихт VI в первые предложены две основные стратегии выбора эрадикационной терапии: индивидуализированная – на основе определения чувствительности к антибактериальным препаратам (фенотипическим или молекулярно-генетическим методом) до их назначения, и эмпирическая, с учетом данных о локальной резистентности *H. pylori* к кларитромицину и мониторинга эффективности схем в регионе [9, 10]. В этой связи возрастает роль молекулярных методов диагностики (в частности, ПЦР в реальном времени, полногеномного секвенирования и цифровой ПЦР) для выявления мутаций *H. pylori*, связанных с резистентностью к кларитромицину, левофлоксацину, тетрациклину и рифабутину [11].

Показатели устойчивости *H. pylori* к антибиотикам неуклонно растут во всем мире, что ведет к снижению эффективности схем лечения этой инфекции [12]. Использование макролидных антибиотиков в лечении респираторных заболеваний привело к росту резистентности *H. pylori* к кларитромицину – основному компоненту тройной терапии первой линии и, соответственно, резкому снижению ее эффективности [13, 14].

В Европе показатели резистентности *H. pylori* к кларитромицину составляют 18–21,4%, левофлоксацину – 11,0–16,3%, метронидазолу – 39,1–56%. Отмечена значительно большая распространенность в странах Центральной и Южной Европы, чем в странах Северной Европы. В Америке зарегистрирована резистентность к кларитромицину на уровне 10% [15, 16]. В Китае первичная резистентность *H. pylori* к кларитромицину, метронидазолу и левофлоксацину оценивается на уровне 28,9; 63,8 и 28,0% соответственно. Показатели устойчивости *H. pylori* аналогичны таковым в Южной Корее [17, 18].

Обобщенный показатель резистентности *H. pylori* к кларитромицину в Российской Федерации за последние десять лет составил 10,39% (95%-ный доверительный интервал (95% ДИ) 7,103–14,219). По результатам исследований, проведенных в Москве и Московской области, выявлена резистентность *H. pylori* к кларитромицину на уровне 10,87%

(95% ДИ 7,280–15,439), Санкт-Петербурге – 22,26% (95% ДИ 9,525–38,470), Смоленске – 5,74% (95% ДИ 3,511–8,789), Казани – 10,0% (95% ДИ 5,023–17,355). Согласно данным метаанализов [19, 20], уровень резистентности к левофлоксацину составил 20%, метронидазолу – 34%, амоксициллину – 1,35%, тетрациклину – 0,98%. Авторы этих метаанализов отметили существенную гетерогенность между включенными исследованиями, ряд из которых был проведен более 10 лет назад, а также различия в применявшихся методиках. Кроме того, данные о низкой резистентности к кларитромицину не подтверждаются сообщениями о недостаточной эффективности стандартной тройной терапии, включающей этот антибиотик. Так, в наблюдательном исследовании «Европейский регистр ведения инфекции *Helicobacter pylori*» (Hp-EuReg) было показано, что в России в 2013–2018 гг. тройная терапия (ингибиторы протонной помпы, кларитромицин, амоксициллин) назначали в 62,8–68,9% случаев. Эффективность 14-дневной тройной терапии у завершивших прием препаратов (per protocol, PP) составила 85%, при анализе начавших терапию (ITT) – 66% [21]. При этом резистентность к антибиотикам в России составила: 24% к кларитромицину, 27% к левофлоксацину, 29% к метронидазолу, 6% к амоксициллину, 0% к тетрациклину [22].

Устойчивость *H. pylori* к антибиотикам связана с формированием мутаций или других генетических изменений, которые нарушают механизмы их действия. Большинство случаев первичной резистентности к кларитромицину (около 90% в западных странах) связано с точечными мутациями в гене 23S рРНК, кодирующем пептидилтрансферазу в V домене 23S рРНК, которые приводят к снижению аффинности макролидов к рибосомам бактериальной клетки, тем самым формируя резистентность [23]. Наиболее распространенными, связанными с устойчивостью, мутациями гена 23S рРНК являются A2142G, A2142C и A2143G [24].

Бактерицидное и бактериостатическое действие левофлоксацина обусловлено связыванием с ДНК-гиразами. Функции ДНК-гиразы *H. pylori* кодируются генами *gyrA* и *gyrB*. Резистентность в первую очередь обусловлена несинонимичными мутациями, приводящими к заменам аминокислот в положениях 87 и 91 в белке *GyrA* [25].

Золотым стандартом в определении чувствительности *H. pylori* к антимикробным препаратам являются фенотипические методы: метод разведений в агаре или метод градиентной диффузии. Эти методы позволяют определить минимальную подавляющую концентрацию антибиотика для каждого тестируемого изолята, полученного культуральным методом, и оценить категорию его чувствительности к исследуемому препарату. Однако необходимости выделения чистой культуры *H. pylori*, методология определения чувствительности с использованием специальных питательных сред и микроаэрофильной атмосферы культивирования, высокие требова-



Таблица 1. Критерии оценки чувствительности *H. pylori* к антимикробным препаратам

Препарат	МПК, мг/л	
	Чувствительный	Резистентный
Кларитромицин	≤ 0,25	> 0,5
Левифлоксацин	≤ 1,0	> 1,0

Примечание. Данные критерии не являются клиническими, а представляют собой эпидемиологические пограничные значения, разделяющие штаммы с природной чувствительностью и штаммы со сниженной чувствительностью.

Таблица 2. Частота встречаемости генетических вариантов в генах антибиотикорезистентности *H. pylori* (*S23 rRNA*, *gyrA*)

Устойчивость	Ген	Нуклеотидная замена	Количество, % (абсолютное значение)
Кларитромицин	<i>S23 rRNA</i>	2142G	28 (7)
		2143G	16 (4)
		wt	56 (14)
Левифлоксацин	<i>gyrA</i>	261A	12 (3)
		261G	4 (1)
		271A	16 (4)
		272G	12 (3)
		261A, 271A	8 (2)
wt	48 (12)		
Двойная устойчивость	<i>S23, gyrA</i>	–	24 (6)

ния к квалификации персонала, большие временные затраты ограничивают применение культуральных методов выделения *H. pylori* и определения чувствительности к антимикробным препаратам в клинической практике [26].

В настоящее время актуальными в определении чувствительности *H. pylori* к антибактериальным препаратам являются молекулярно-генетические методы – ПЦР в режиме реального времени. Коммерческие наборы для ПЦР обеспечивают высокую чувствительность (95%) и специфичность (100%) как для выявления *H. pylori*, так и определения чувствительности к антимикробным препаратам [27]. Такие тесты выполняются быстро (в течение нескольких часов) и не требуют специальных условий транспортировки, в отличие от культурального метода.

Цель исследования – определение чувствительности и специфичности выявления резистентности изолятов *H. pylori* к кларитромицину и левифлоксацину методом ПЦР.

Материалы и методы

Протестировано 25 образцов чистой культуры *H. pylori*, у которых уже была определена чувствительность к кларитромицину и левифлоксацину методом серийных разведений в агаре. Фенотипическое определение антибиотикорезистентности штаммов проводили в НИИ антимикробной химиотерапии Смоленского государственного медицинского университета, последующее молекулярно-генетическое определение резистентности выполнено в Московском клиническом научно-практическом центре им. А.С. Логинова. Исследование проводилось вслепую: после того как были

установлены аллельные варианты в генах антибиотикорезистентности, выполняли сравнительный анализ молекулярно-генетических данных с фенотипическими.

Фенотипическую резистентность определяли методом серийных разведений в катионсбалансированном агаре Мюллера – Хинтона (OXOID, Великобритания) с добавлением бараньей крови (итоговая концентрация 5%) (E&O Laboratories Ltd., Шотландия) в соответствии с рекомендациями Института по клиническому и лабораторному стандартам США (CLSI).

Использовали критерии оценки чувствительности *H. pylori* к антимикробным препаратам, представленные в табл. 1.

Молекулярно-генетическое определение резистентности проводили путем выявления аллельных вариантов в генах, ответственных за резистентность к кларитромицину – *S23* (2142A>C, 2142A>G и 2143A>G) и левифлоксацину – *gyrA* (87-й кодон 259A>T, 261T/C>G/A и 91-й кодон 271G>A, 271G>T, 272A>G).

ДНК из культур выделяли набором «Проба НК» (ДНК-технология) согласно инструкции производителя. Качество выделенной ДНК оценивали с помощью спектрофотометра Biowave II (Biochrom, США). Определение аллельных вариантов в генах резистентности выполняли методом секвенирования по Сенгеру с использованием собственной разработанной тест-системы на 3500 генетическом анализаторе (Applied biosystems, США).

Результаты

Установлено, что 11 образцов из 25 имели мутации в гене устойчивости к кларитромицину, в 13 образцах зарегистрированы мутации в гене устойчивости к левифлоксацину, шесть образцов имели двойную устойчивость. Генетические варианты в генах резистентности *S23, gyrA* 25 образцов культур *H. pylori* представлены в табл. 2.

Стоит отметить, что у некоторых культур было обнаружено состояние перехода от дикого типа к мутантному (рис. 1). Чаще всего состояние перехода наблюдалось в гене *gyrA*, обуславливающим устойчивость к левифлоксацину.

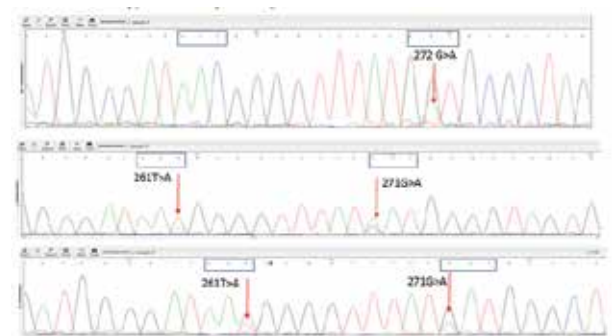
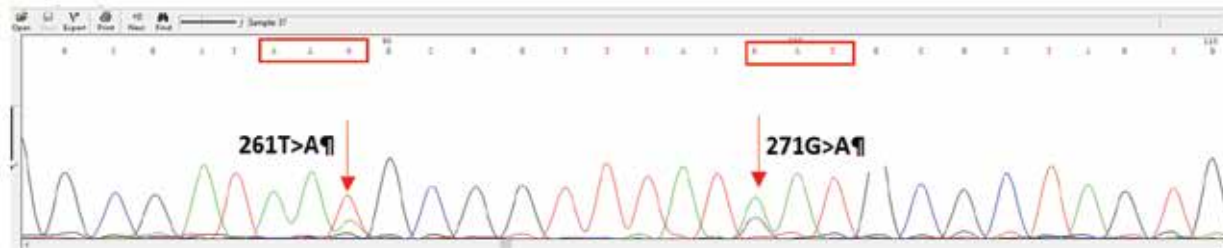


Рис. 1. Хроматограммы нуклеотидных последовательностей ДНК культур *H. pylori*, демонстрирующие переходные состояния в гене *gyrA*

Таблица 3. Сравнение резистентности *H. pylori* по данным двух методов

Антибиотик	Молекулярно-генетический метод		Фенотипический метод	
	Резистентные	Чувствительные	Резистентные	Чувствительные
Кларитромицин	11	14	11	14
Левифлоксацин	13	12	14	11
Всего	25		25	

Рис. 2. Хроматограмма нуклеотидных последовательностей ДНК культуры *H. pylori*, демонстрирующая переходные состояния в гене *gyrA*

При сравнении данных о резистентности *H. pylori*, полученных с помощью молекулярно-генетического метода, с данными фенотипического метода (серийных разведений в агаре) было отмечено, что все 11 культур с фенотипической устойчивостью к кларитромицину имели мутации в гене *S23* рРНК. Из 14 культур с фенотипической резистентностью к левифлоксацину 13 культур имели соответствующие мутации в гене *gyrA* (табл. 3).

Две культуры *H. pylori*, у которых были выявлены мутации в гене *gyrA*, не имели фенотипической резистентности. В одной из них наблюдался переход аллеля дикого типа в мутантный (рис. 2).

Таким образом, чувствительность и специфичность молекулярно-генетического метода определения резистентности к кларитромицину составили 100%, в отношении резистентности к левифлоксацину – 93 и 92% соответственно.

Обсуждение

Данные о резистентности *H. pylori* к кларитромицину, полученные с помощью молекулярно-генетического тестирования, полностью соответствовали таковым, полученным фенотипическим методом. Все 14 культур с фенотипической резистентностью к кларитромицину имели мутации в гене *S23* рРНК. В случае с резистентностью к левифлоксацину результаты тоже вполне убедительные: 13 культур из 14 с фенотипической резистентностью к левифлоксацину имели мутации в гене *gyrA*. В двух культурах, не имеющих фенотипической резистентности к левифлоксацину, были обнаружены мутации в гене *gyrA*. Однако в одной из них наблюдалось состояние перехода от дикого типа аллеля к мутантному. Во второй культуре мутация была обнаружена в 87-м кодоне гена *gyrA*.

Известно, что существуют региональные особенности антибиотикорезистентности *H. pylori*. Значимость нуклеотидных замен в 87-м кодоне гена *gyrA*

именно для российской популяции еще предстоит уточнить. Возможно, резистентность к левифлоксацину в дополнение к заменам в 87-м, 91-м кодах обуславливают иные варианты данного гена или других генов. Так, в исследовании P. Subsomwong и соавт. (2022) в популяции Мьянмы почти все устойчивые к левифлоксацину изоляты имели аминокислотную замену в положении 91 (Asp-91 на Asn или Tyr) и не имели замен в 87-м кодоне. Однако у устойчивых к левифлоксацину штаммов в соседних с Мьянмой странах Юго-Восточной Азии, таких как Индонезия, Малайзия и Камбоджа, были обнаружены обе мутации [28]. Во многих исследованиях описаны одиночные или двойные мутации в положениях Asn87 и Asp91 как наиболее частые сайты мутаций в резистентных изолятах *H. pylori* из слизистой оболочки желудка [29–31]. Научные исследования подтверждают, что вариации аминокислот придают устойчивость к антибиотикам в зависимости от географического положения [29, 32, 33].

Исследования резистентности *H. pylori* к антибиотикам, особенно к кларитромицину и левифлоксацину, приобретают особую значимость при выборе стратегии лечения инфекции *H. pylori* как при индивидуализированном выборе эрадикационной терапии на основе определения чувствительности к антимикробным препаратам (фенотипическим или молекулярно-генетическим методом) до их назначения, так и для обоснования эмпирической стратегии в регионе, основанной на мониторинге локальной резистентности *H. pylori* к кларитромицину.

Представленные данные свидетельствуют о высокой диагностической ценности молекулярно-генетического метода, позволяющего быстро и точно определять устойчивость *H. pylori* к кларитромицину и левифлоксацину. Разработанная тест-система с определением мутаций к кларитромицину *S23* (2142A>C, 2142A>G и 2143A>G) и левифлоксацину *gyrA* (87-й кодон 259A>T, 261T/C>G/A



и 91-й кодон 271G>A, 271G>T, 272A>G) обладает высокой чувствительностью и специфичностью. Требуется дальнейшие исследования для определения резистентности к указанным антибиотикам методом ПЦР в биоптатах с контролем фенотипическим методом. ☉

Литература

1. Hooi J.K.Y., Lai W.Y., Ng W.K., et al. Global prevalence of *Helicobacter pylori* infection: systematic review and meta-analysis. *Gastroenterology*. 2017; 153 (2): 420–429.
2. Герман С.В., Зыкова И.Е., Модестова А.В., Ермаков Н.В. Распространенность инфекции *H. pylori* среди населения Москвы. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2010; 2: 25–30.
3. Курилович С.А., Решетников О.В. Эпидемиологические исследования в гастроэнтерологии: многолетний сибирский опыт изучения *Helicobacter pylori* и ассоциированных заболеваний. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2015; 115 (3): 4–10.
4. Лазебник Л.Б., Васильев Ю.В., Щербakov П.Л. и др. *Helicobacter pylori*: распространенность, диагностика, лечение. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2010; 2: 3–7.
5. Bordin D., Morozov S., Plavnik R., et al. *Helicobacter pylori* infection prevalence in ambulatory settings in 2017–2019 in Russia: the data of real-world national multicenter trial. *Helicobacter*. 2022; 27 (5): e12924.
6. de Brito B.B., da Silva F.A.F., Soares A.S., et al. Pathogenesis and clinical management of *Helicobacter pylori* gastric infection. *World J. Gastroenterol*. 2019; 25 (37): 5578–5589.
7. Gravina A.G., Zagari R.M., De Musis C., et al. *Helicobacter pylori* and extragastric diseases: a review. *World J. Gastroenterol*. 2018; 24 (29): 3204.
8. Бордин Д.С. Ошибки диагностики и лечения инфекции *Helicobacter pylori*: в преддверии новых согласительных документов. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2021; 193 (9): 5–14.
9. Malfertheiner P., Megraud F., Rokkas T., et al. Management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht VI/Florence consensus report. *Gut*. 2022; gutjnl-2022-327745.
10. Бордин Д.С., Ливзан М.А. Консенсус Маастрихт VI опубликован: что нового? Эффективная фармакотерапия. 2022; 18 (22): 72–84.
11. Бордин Д.С., Ливзан М.А., Осипенко М.Ф. и др. Ключевые положения консенсуса Маастрихт VI. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2022; 205 (9): 5–21.
12. Лазебник Л.Б., Бордин Д.С., Дехнич Н.Н. и др. Необходимость усиления мер по диагностике и лечению хеликобактерной инфекции в России. Меморандум. *Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология*. 2021; 3: 83–96.
13. Huang C.C., Tsai K.W., Tsai T.J., Hsu P.I. Update on the first-line treatment for *Helicobacter pylori* infection – a continuing challenge from an old enemy. *Biomarker Res*. 2017; 5 (1): 1–6.
14. Nyssen O.P., Vaira D., Tepes B., et al. Room for improvement in the treatment of *Helicobacter pylori* infection: lessons from the European Registry on *H. pylori* Management (Hp-EuReg). *J. Clin. Gastroenterol*. 2022; 56 (2): e98–e108.
15. Megraud F., Bruyndonckx R., Coenen S., et al. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics in Europe in 2018 and its relationship to antibiotic consumption in the community. *Gut*. 2021; 70: 1815–1822.
16. Savoldi A., Carrara E., Graham D.Y., et al. Prevalence of antibiotic resistance in *Helicobacter pylori*: a systematic review and meta-analysis in World Health Organization regions. *Gastroenterology*. 2018; 155 (5): 1372–1382.e17.
17. Liu Y., Wang S., Yang F., et al. Antimicrobial resistance patterns and genetic elements associated with the antibiotic resistance of *Helicobacter pylori* strains from Shanghai. *Gut Pathog*. 2022; 14 (1): 14.
18. Cho J.H., Jin S.Y. Current guidelines for *Helicobacter pylori* treatment in East Asia 2022: differences among China, Japan, and South Korea. *World J. Clin. Cases*. 2022; 10 (19): 6349–6359.
19. Маев И.В., Андреев Д.Н., Бордин Д.С. и др. Резистентность *Helicobacter pylori* к кларитромицину в Российской Федерации. *Эффективная фармакотерапия*. 2020; 16 (30): 16–22.
20. Андреев Д.Н., Маев И.В., Кучерявый Ю.А. Резистентность *Helicobacter pylori* в Российской Федерации: метаанализ исследований за последние 10 лет. *Терапевтический архив*. 2020; 11: 24–30.
21. Бордин Д.С., Эмбутниекс Ю.В., Воложанина Л.Г. и др. Европейский регистр *Helicobacter pylori* (Hp-EuReg): как изменилась клиническая практика в России с 2013 по 2018 г. *Терапевтический архив*. 2019; 91 (2): 16–24.
22. Bujanda L., Nyssen O.P., Vaira D., et al. Antibiotic resistance prevalence and trends in patients infected with *Helicobacter pylori* in the period 2013–2020: results of the European Registry on *H. pylori* Management (Hp-EuReg). *Antibiotics (Basel)*. 2021; 10 (9): 1058.
23. Vital J.S., Tanoeiro L., Lopes-Oliveira R., Vale F.F. Biomarker characterization and prediction of virulence and antibiotic resistance from *Helicobacter pylori* next generation sequencing data. *Biomolecules*. 2022; 12 (5): 691.
24. Marques A.T., Vitor J.M.B., Santos A., et al. Trends in *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin: from phenotypic to genomic approaches. *Microb. Genom*. 2020; 6: e000344.
25. Mannion A., Dzink-Fox J., Shen Z., et al. *Helicobacter pylori* antimicrobial resistance and gene variants in high- and low-gastric-cancer-risk populations. *J. Clin. Microbiol*. 2021; 59 (5): e03203–e03220.



26. Бордин Д.С., Войнован И.Н., Колбасников С.В., Эмбунтиекс Ю.В. Методы диагностики инфекции *Helicobacter pylori* в клинической практике. *Терапевтический архив*. 2018; 90 (12): 133–139.
27. Bharath T.S., Reddy M.S., Dhanapal R., et al. Molecular detection and correlation of *Helicobacter pylori* in dental plaque and gastric biopsies of dyspeptic patients. *J. Oral Maxillofac. Pathol.* 2014; 18 (1): 19–24.
28. Subsomwong P., Doohan D., Fauzia K.A., et al. Next-generation sequencing-based study of *Helicobacter pylori* isolates from Myanmar and their susceptibility to antibiotics. *Microorganisms*. 2022; 10 (1): 196.
29. Zerbetto De Palma G., Mendiondo N., Wonaga A., et al. Occurrence of mutations in the antimicrobial target genes related to levofloxacin, clarithromycin, and amoxicillin resistance in *Helicobacter pylori* isolates from Buenos Aires city. *Microb. Drug. Resist.* 2016; 23: 351–358.
30. Garcia M., Raymond J., Garnier M., et al. Distribution of spontaneous gyrA mutations in 97 fluoroquinolone-resistant *Helicobacter pylori* isolates collected in France. *Antimicrob. Agents. Chemother.* 2012; 56: 550–551.
31. Ziver-Sart T. Point mutations at gyrA and gyrB genes of levofloxacin resistant *Helicobacter pylori* strains and dual resistance with clarithromycin. *Clin. Lab.* 2021; 67 (10).
32. Trespalacios A.A., Rimbara E., Otero W., et al. Improved allele-specific PCR assays for detection of clarithromycin and fluoroquinolone resistant of *Helicobacter pylori* in gastric biopsies: identification of N87I mutation in gyrA. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* 2015; 81: 251–255.
33. Trespalacios-Rangél A.A., Otero W., Arévalo-Galvis A., et al. Surveillance of levofloxacin resistance in *Helicobacter pylori* isolates in Bogotá-Colombia (2009–2014). *PLoS One*. 2016; 11 (7): e0160007.

Possibilities of the Molecular Genetic Method for Detecting Resistance to Clarithromycin and Levofloxacin in *Helicobacter pylori*

L.A. Tsapkova, PhD¹, V.V. Polyakova¹, N.A. Bodunova, PhD¹, I.V. Baratova¹, I.N. Voynovan, PhD¹, N.N. Dekhnich, PhD², N.V. Ivanchik, PhD², E.A. Sabelnikova, PhD^{1,4}, D.S. Bordin, PhD, Prof.^{1,3,4}

¹ A.S. Loginov Moscow Clinical Scientific Center

² Smolensk State Medical University

³ Tver State Medical University

⁴ A.I. Yevdokimov Moscow State University of Medicine and Dentistry

Contact person: Larisa A. Tsapkova, l.capkova@mknc.ru

About half of the world's population is infected with the bacterium *Helicobacter pylori*, which in all cases leads to the development of chronic gastritis, which can progress into peptic ulcer, MALT lymphoma and stomach cancer. *H. pylori* eradication prevents the development of these diseases. The growth of *H. pylori* resistance to antibiotics, especially to clarithromycin, is the main reason for the ineffectiveness of treatment and is a serious problem. The Maastricht VI Consensus offers two main strategies for the choice of the eradication therapy: individualized – based on determining sensitivity to antibacterial drugs (phenotypic or molecular genetic method) before their appointment, and empirical, taking into account data on local *H. pylori* resistance to clarithromycin and monitoring the effectiveness of regimens in the region. In this regard, the role of molecular genetic methods for assessing the resistance of *H. pylori* to antibiotics increases.

The aim of the study – to determine the sensitivity and specificity of detecting the resistance of *H. pylori* isolates to clarithromycin and levofloxacin by PCR.

Materials and methods. 25 samples (isolates) of *H. pylori* have been tested, in which sensitivity to clarithromycin and levofloxacin has already been determined by the method of serial dilutions in agar. Molecular genetic detection of resistance was performed by determining allelic variants in the genes responsible for resistance to clarithromycin S23 (2142A>C, 2142A>G and 2143A>G) and levofloxacin gyrA (87 codon 259A>T, 261T/C>G/A and 91 codon 271G>A, 271G>T, 272A>G).

Results. It was found that 11 out of 25 samples had mutations in the clarithromycin resistance gene, mutations in the levofloxacin resistance gene were registered in 13 samples, and six samples had double resistance. All 11 cultures with phenotypic resistance to clarithromycin had mutations in the S23 rRNA gene.

Of the 14 cultures with phenotypic resistance to levofloxacin, 13 cultures had mutations in the gyrA gene. The sensitivity and specificity of the molecular genetic method for determining resistance to clarithromycin was 100%, with respect to resistance to levofloxacin, these indicators were 93 and 92%, respectively.

Conclusion. The molecular genetic method makes it possible to determine the resistance of *H. pylori* to clarithromycin and levofloxacin quickly and accurately, promotes the selection of personalized treatment regimens for patients with *H. pylori* infection.

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