

# Критический рост резистентности *Helicobacter pylori* к кларитромицину в педиатрической и взрослой гастроэнтерологической практике

Е.А.Корниенко<sup>1</sup>, А.Н.Суворов<sup>2</sup>, Е.И.Ткаченко<sup>3</sup>, Ю.П.Успенский<sup>3</sup>, Н.В.Барышникова<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Санкт-Петербургская государственная педиатрическая медицинская академия

<sup>2</sup> НИИ экспериментальной медицины РАМН, Санкт-Петербург

<sup>3</sup> Санкт-Петербургская государственная медицинская академия им. И.И.Мечникова

В 2004 г. F. Megraud представил данные о резистентности *Helicobacter pylori* к антибактериальным препаратам, определившие последующий выбор тех или иных схем эрадикации. Так, показатели резистентности штаммов микроорганизма к метронидазолу были в пределах 19–42% в странах Европы и 33–37% – в США, 9–12% – в Японии, 53% – в Бразилии и 77% – в Мексике. В отношении кларитромицина эти показатели составляли в США и Японии около 13%. В европейских странах они колебались в широких пределах: сравнительно низкие в странах Северной (4,4%) и Центральной (8,7%) Европы и, напротив, высокие (24%) в странах Южной Европы.

В 1999–2002 гг. в Европе было проведено проспективное многоцентровое исследование, включавшее 16 педиатрических центров в 14 странах. Всего были обследованы 1233 ребенка, 41% которых были родом из Африки и Ближнего Востока. Исследовалась как первичная (до лечения), так и вторичная (при неудачном лечении) резистентность. Первичная резистентность к кларитромицину была выявлена у 20% детей, вторичная – у 42%. Первичная резистентность к кларитромицину была достоверно выше у детей до 6 лет, чем у подростков старше 12 лет, и преобладала у жителей Южной Европы по сравнению с Северной. Эти различия легко объяснимы более частым назначением макролидов для лечения внежелудочных (в основном, респираторных) заболеваний у детей раннего возраста и существованием определенных ограничений в назначении препаратов этой группы в северо-европейских странах. В Восточной Европе отдельные исследования также показали высокую резистентность к кларитромицину у детей. Так, в Болгарии она составила 12,4%, а в Польше – 23,5%.

Рядом исследований была показана тенденция к росту резистентности к кларитромицину: в США и Канаде до 2000 г. она составляла 4%, а в 2004 г. – 11–12%.

В 2008–2009 гг. в Европе было проведено повторное исследование антибиотикорезистентности *H. pylori*, в которое были включены 2183 пациента из 12 стран (см. таблицу).

Среди пациентов были как взрослые, так и дети. Обращает на себя внимание значительный рост резистентности *H. pylori* у детей в Европе к кларитромицину, который составил более 12% за 7 лет. Основной причиной роста резистентности *H. pylori* к кларитромицину является не столько предшествующая неэффективная эрадикационная терапия, сколько широкое использование макролидов при

Резистентность *H. pylori* к антибиотикам

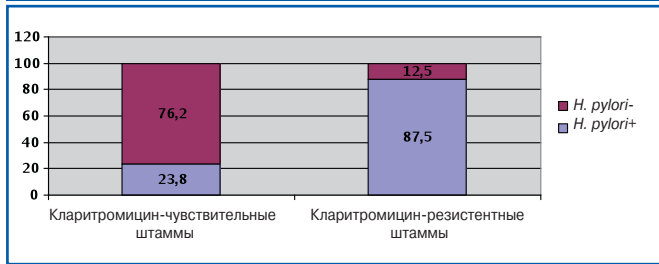
Антибиотик	Взрослые, %	Дети, %
Кларитромицин	17	32,5
Метронидазол	37,2	26
Амоксициллин	1	0,31
Тетрациклин	1,12	0,31
Левифлоксацин	14,6	2,47
Рифабутин	1	0

лечении других заболеваний. Поскольку дети чаще получают препараты этой группы, то и распространенность устойчивых штаммов *H. pylori* среди них существенно выше, чем у взрослых. Так, исследование, проведенное в японских семьях, показало, что хотя члены одной семьи обычно заражены идентичными штаммами *H. pylori*, резистентность к кларитромицину выше у детей. В целом, резистентность *H. pylori* к кларитромицину возрастает пропорционально его потреблению в данном регионе.

Все препараты группы макролидов характеризуются развитием перекрестной резистентности штаммов *in vitro*, но не все макролиды в равной мере могут формировать такую у *H. pylori in vivo*, поскольку это зависит также от способности препарата накапливаться в слизистом слое. Поскольку кларитромицин быстро достигает ингибирующей концентрации на поверхности слизистой оболочки желудка, после курса лечения 2/3 не уничтоженных штаммов *H. pylori* становятся резистентными к нему. Этого нельзя сказать, например, об азитромицине: он имеет низкую эффективность эрадикации (62%), но вторичная резистентность *H. pylori* к нему развивается только в 23% случаев.

Антибиотикорезистентность *H. pylori* является главной причиной неэффективности терапии. Так, суммируя результаты 20 европейских исследований, в которых проведена оценка результатов стандартной тройной терапии 1-й линии, включавшей ингибиторы протонной помпы, амоксициллин и кларитромицин у 2751 пациента, можно заключить, что в случае чувствительности штаммов эрадикация достигается в среднем у 87,8%, а при устойчивости к кларитромицину – только у 18,3% пациентов. Это 70% снижение эффективности лечения подчеркивает клиническое значение резистентности *H. pylori* к кларитромицину.

**Частота эрадикации *H. pylori* в группах с кларитромицин-чувствительными и кларитромицин-резистентными штаммами при использовании схем с кларитромицином.**



Мы исследовали биоптаты антрального отдела желудка 153 детей с *H. pylori*-ассоциированными гастродуоденальными заболеваниями с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР). Для выделения ДНК *H. pylori* из исследуемого материала использовались наборы «ДНК-технология», «Проба ГС» (ЗАО НПФ, Россия). Исследование проводилось в Лаборатории молекулярной генетики ГБ № 31 (зав. лабораторией канд. мед. наук А.А.Лыщев) и в научно-исследовательской лаборатории «Диагностика» на базе НИИ экспериментальной медицины СЗО РАМН.

Мутации (а исследование проводилось только по трем из множества известных участков в структуре гена 23S РНК – A2142G, A2143G, T2717C), обуславливающие резистентность *H. pylori* к кларитромицину, были выявлены у 39% детей. Эти данные лишь немногим выше результатов, полученных при исследовании резистентности *H. pylori* к кларитромицину у детей в Европе в 2008–2009 гг.

Исследование эффективности схемы, рекомендованной в качестве стандартной, Маастрихтский консенсус III в Европе (эзомепразол + кларитромицин + метронидазол) в рекомендуемых дозах продолжительностью 10 дней, проведенное нами у 20 детей с *H. pylori*-ассоциированными гастродуоденальными заболеваниями, показало низкую эффективность – 14,3%. Столь низкий результат объясняется высоким уровнем резистентности *H. pylori* как к кларитромицину, так и метронидазолу. В связи с полученными неутешительными результатами мы не можем рекомендовать эту стандартную схему к использованию в России.

С учетом локальных особенностей штаммов *H. pylori* Маастрихтский консенсус III внес одну очень важную поправку: если устойчивость *H. pylori* к кларитромицину в популяции конкретного региона превышает 15–20%, а к метронидазолу выше 40%, эти антибактериальные препараты не должны применяться в схемах эрадикации.

Мы проанализировали зависимость эффективности эрадикационной терапии от чувствительности штамма *H. pylori* к кларитромицину. Суммарно по всем группам больных, в эрадикационную схему которых были включены макролиды, кларитромицин-чувствительные штаммы *H. pylori* были выделены в 56,8% случаев, а кларитромицин-резистентные – в 43,2%. Эрадикационная терапия была достоверно более эффективна у детей с кларитромицин-чувствительными штаммами: в 76,2% случаев удалось добиться эрадикации *H. pylori*. Напротив, процент эрадикации у детей с кларитромицин-резистентным штаммом *H. pylori* был минимален и составил всего 12,5% (см. рисунок).

Некоторые отечественные авторы пытаются доказать некорректность молекулярно-генетического метода оценки резистентности *H. pylori* к кларитромицину непосредственно в биоптатах слизистой оболочки желудка, аргументируя это разнообразием возможных мутаций и несовпадением с результатами культуральных методов (минимальная ингибирующая концентрация – МИК, E-тест).

Действительно, существует понятие генотипической (выявленной с помощью ПЦР) и фенотипической (выявленной с помощью культуральных методов) антибиотикорезистентности *H. pylori*. Однако сопоставление их результатов, проведенное в исследовании под руководством D.Vaira, показало высокую степень конкордантности (71,2%) при более высокой чувствительности молекулярно-генетического метода. Генотипическая резистентность *H. pylori* к кларитромицину была выявлена у 37,6% больных, ранее не получавших лечения, фенотипическая – у 18,4%. Несмотря на разницу в частоте выявленной двумя методами резистентности, как одна, так и другая сопровождалась значительным снижением результатов эрадикационной терапии при назначении традиционной схемы: омепразол + амоксициллин + кларитромицин продолжительностью 10 дней.

Существующие отличия в данных молекулярно-генетического анализа и данных бактериологии характерны практически для всех бактериальных патогенов. Так, например, диагностика колонизации урогенитальной сферы женщин стрептококками группы В, по данным немецких исследователей, по результатам молекулярных методов практически в 2 раза превосходит культуральные. В первую очередь это объясняется чувствительностью метода (такого как ПЦР или гибридизация), позволяющего выявлять порядка 10–100 бактерий в образце. В случае использования ПЦР в реальном времени резко возрастает и специфичность исследования, превосходящая другие подходы. Что же касается диагностики мутаций в генах 23S РНК, то существующие методы помимо амплификации участка гена с мутацией требуют также проведения специфического разрезания участка гена рестрикционной эндонуклеазой. Последняя процедура существенно повышает специфичность метода. Различия в возможностях культуральных методов и молекулярно-генетических подходах наиболее четко проявляются в случае диагностики хеликобактерных поражений желудочно-кишечного тракта. Особенностью данного возбудителя являются его медленный рост и высокая требовательность к условиям культивирования. Даже в наиболее хорошо оснащенных и специализированных лабораториях обычное время культивирования составляет неделю. Обычно для выращивания штаммов в агаре *H. pylori* культивируют несколько дней в микроаэрофильных условиях (5% O<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, и 85% N<sub>2</sub>), а уже потом выделенный штамм субкультивируют для тестирования как такового. При этом определение МИК требует предварительного подращивания культуры *H. pylori* на среде Мюллера–Хинтона (Mueller–Hinton) в присутствии 5% бараньей крови 48 ч, после чего бактериальная суспензия в концентрации 107 колоний на миллилитр вносится на чашку с агаром, содержащую антибиотик. Определение МИК проводят через 72 ч инкубации в микроаэрофильных условиях.

Нетрудно подсчитать, что для качественного бактериологического исследования уже выросшей культуры потребуется 5 сут, разнообразные питательные среды и дорогостоящее оборудование. С учетом получения первичной культуры, если все пройдет успешно для бактериолога и бактерии вырастут, реальный срок бактериологического тестирования – 2 нед в очень хорошо экипированной лаборатории с высококвалифицированными сотрудниками. Реально в России таких лабораторий единицы. Даже в случае успешно проведенного культурального исследования лечащий врач ничего не узнает о вирулентности выявленного штамма, т.е. ни о наличии генов патогенности, ни о тем более их экспрессии.

В качестве сравнения для ПЦР-диагностики *H. pylori* вся процедура от получения материала до получения результата, причем с точной идентификацией мутации на гене рибосомной РНК и ожидаемой степени антибиотикорезистентности, ассоциированной с такой мутацией, займет не более 2 рабочих дней. При желании, результат можно получить за 1 сут. Существенно, что современная молекулярная диагностика позволяет одновременно ответить не на один, а на несколько вопросов, касающихся природы возбудителя, его штаммовых особенностей и возможных эпидемиологических связей, наличия генов вирулентности в геноме, а также и наиболее вероятной устойчивости к антибиотикам. При этом методология ПЦР, бывшая дорогой и сложной 10 лет назад, существенно упростилась и удешевилась. Снизился и риск методических ошибок из-за возросшей стандартизации реактивов и оборудования.

В западно-европейских странах сейчас применяется метод одновременной оценки с помощью ПЦР в биоптате слизистой оболочки желудка мутаций двух генов, обуславливающих резистентность к двум антибиотикам – кларитромицину и левофлоксацину (GenoTypeHelicoDR). Метод был сопоставлен с культуральным (Е-тест), он продемонстрировал высокую степень корреляции и рекомендован для практического использования как информативный и удобный, не требующий бактериологического исследования. Резистентность *H. pylori* к кларитромицину в группе европейских пациентов, как показало исследование, проведенное под руководством F.Megraud, составила 46%, к левофлоксацину – 25%.

Исследователи, ратующие за отход от молекулярных методов оценки устойчивости *H. pylori* к кларитромицину, обрекают подавляющее большинство пациентов на терапию вообще без учета устойчивости к данному препарату. На самом деле существует достаточный клинический опыт, показывающий, что использование определенных схем терапии рано или поздно приведет к возрастанию резистентности. Ятрогенную селекцию антибиотикорезистентных штаммов в популяции никто не отменял. Неслучайно, что при вторичных инфекциях в штаммах *H. pylori* появляются новые множественные мутации. Бактерии, как и все живые объекты, стремятся к выживанию в любых условиях, а значит, происходит селекция штаммов максимально резистентных к терапии. Антибиотиковая война врачей с бактериями уже давно проиграна, и если тот или иной условный барьер ле-

карственной устойчивости не преодолен, то это произойдет в недалеком будущем. Наши шансы заключаются только в быстрой, точной и своевременной диагностике патогена и спектра его антибиотикорезистентности. Поэтому ПЦР-диагностика устойчивости *H. pylori* к антибиотикам, в частности к кларитромицину, оправдана вне зависимости от эпидемиологического порога.

В публикациях последних лет на данную тему не случайно цитируются преимущественно зарубежные данные. При этом великолепно известно, что некорректно экстраполировать данные о молекулярной эпидемиологии на ситуацию в другой стране. В таких государствах, как Италия или Великобритания, исследования проводят строго регионально, после чего данные анализируются по всей стране. Молекулярной эпидемиологии бактериальных инфекций уделяется в данных странах самое большое значение. У нас же наблюдается обратная картина. Эпидемиологические молекулярно-генетические данные по большинству инфекций вообще очень скудны. В полной мере это относится к диагностике *H. pylori* и особенностей генотипа вирулентности у штаммов, полученных от больных, а также спектра мутаций, приводящих к лекарственной устойчивости. Можно лишь предполагать, что мутационные изменения, приводящие к кларитромицин-устойчивости в штаммах, циркулирующих в России, будут сходными с южно-корейскими или южно-тайваньскими, однако уверенности в этом, с учетом многообразия мутаций и их постоянно растущим количеством, нет. В этой связи нам представляется чрезвычайно важным получить достоверную картину, отражающую штаммовые особенности *H. pylori* именно по нашей стране. Для этого необходимо проведение широкого многоцентрового многорегионального исследования устойчивости штаммов *H. pylori* к кларитромицину в России с предоставлением конкретных практических рекомендаций врачебному сообществу. Примером такого рода исследований, выполненных с применением современных и точных молекулярно-генетических методов ПЦР как в педиатрической, так и взрослой гастроэнтерологической практике, являются совместные работы гастроэнтерологов и микробиологов Санкт-Петербурга, согласно результатам которых резистентность *H. pylori* к кларитромицину у детей и взрослых давно значительно превысила максимально допустимый порог и составила около 40%.

— \* —