



Определение резистентности *Helicobacter pylori* к кларитромицину в образцах биоптатов слизистой оболочки желудка с использованием TaqMan® MGB-зондов

А. В. Воропаева, А. Д. Борсук, Н. И. Шевченко, С. М. Мартыненко

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

Резюме

Цель исследования. Изучить первичную резистентность *H. pylori* к кларитромицину жителей Гомельской области методом полимеразной цепной реакции в реальном времени (ПЦР РВ) с использованием TaqMan® MGB-зондов.

Материалы и методы. В исследование включено 184 пациента с диагнозом гастрита и дуоденита, К29, медиана возраста — 48,5 года (25 и 75 % — 37 и 61 год). Согласно анкетным данным пациентов, эрадикационная терапия с применением кларитромицина не проводилась. Для определения резистентности *H. pylori* к кларитромицину использовали метод ПЦР РВ с применением TaqMan® MGB-зондов.

Результаты. Все 184 исследуемых образца ДНК были положительными по гену *Rnase P* (ВКО) и учитывались при дальнейшем анализе (Ct, HEX 20,20–34,14). ДНК гена *cagH* (Ct, FAM 21,26–33,04), свидетельствующая об инфицировании бактерией, подтверждена в 152 образцах (82,6 %). ДНК гена *23SrRNA* (точные мутации A2142G и A2143G) выявлена в 16 из 152 образцов ДНК — 10,5 % (Ct, Hex 20,24–31,17). 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 кларитромицину у жителей Гомельской области составила 10,5 %, и применение тройной эрадикационной терапии первой линии, включающей ИПП, амоксициллин и кларитромицин, в качестве эмпирической в данном регионе согласуется с рекомендациями Маастрихт III-VI и постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 01.06.2017 № 54: клинический протокол «Диагностика и лечение пациентов с заболеваниями органов пищеварения». Применение ПЦР РВ с использованием TaqMan® MGB-зондов обосновано для определения резистентности *H. pylori* к кларитромицину, назначения индивидуализированного лечения и оценки эффективности схем эрадикации.

Ключевые слова: *H. pylori*, праймеры, полимеразная цепная реакция в реальном времени, TaqMan® MGB-зонды, резистентность

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

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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 АВ, Борсук АД, Шевченко НИ, Мартыненко СМ. Определение резистентности *Helicobacter pylori* к кларитромицину в образцах биоптатов слизистой оболочки желудка с использованием TaqMan® MGB-зондов. Проблемы здоровья и экологии. 2023;20(1):144–151. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2023-20-1-18>

Determination of *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin in biopsy samples of gastric mucosa using TaqMan® MGB probes

Alla V. Voropaeva, Alexey D. Borsuk,
Natalia I. Shevchenko, Sviatlana M. Martynenko

Republican Research Centre for Radiation Medicine and Human Ecology, Gomel, Belarus

Abstract

Objective. To study primary resistance of *H. pylori* to clarithromycin in residents of Gomel region by real-time polymerase chain reaction (PCR RT) using TaqMan® MGB probes.

Materials and methods. The study included 184 patients diagnosed with gastritis and duodenitis, K29, median age 48.5 years (25% and 75% were 37 and 61 years old). According to the patients' questionnaires, no clarithromycin-based eradication therapy was administered. To determine the resistance of *H. pylori* to clarithromycin, a PCR RV method using TaqMan® MGB probes was used.

Results. All 184 tested DNA samples were positive for the Rnase P gene (ICS) and were considered in further analysis (Ct, HEX 20.20-34.14). DNA from the *cagH* gene (Ct, FAM 21.26-33.04), indicating infection with the bacterium, was confirmed in 152 samples (82.6%). DNA from the 23SrRNA gene (point mutations A2142G and A2143G) was detected in 16 of 152 DNA samples - 10.5 % (Ct, Hex 20.24-31.17). The positive control samples had characteristic curve growth in the corresponding detection channels; no curve growth was observed in the negative samples.

Conclusion. The primary resistance of *H. pylori* to clarithromycin in the residents of Gomel region was 10.5%, and the use of triple first-line eradication therapy, including PPIs, amoxicillin and clarithromycin, as empirical in this region is consistent with the Maastricht III-VI recommendations and Decree of the Ministry of Health of the Republic of Belarus of 01.06.2017 № 54: clinical protocol "Diagnosis and treatment of patients with digestive diseases." The use of PCR RT using TaqMan® MGB probes is justified to determine the resistance of *H. pylori* to clarithromycin, to prescribe individualized treatment and to evaluate the effectiveness of eradication regimens.

Keywords: *H. pylori*, primers, real-time polymerase chain reaction, TaqMan® MGB probes, resistance, clarithromycin

Author contributions. Voropaeva A.V.: idea, concept, planning and implementation of research, analysis and processing of the material and their presentation, bibliography; Borsuk A.D.: material sampling; Shevchenko N.I.: material analysis, general editing; Martynenko S.M.: research execution.

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Funding. The study was carried out as part of task 3.12 "To study the molecular genetic factors of *H. pylori* resistance to antimicrobial drugs to optimize the method of eradication" 2019-2021, subprogram 4.2 "Fundamental aspects of medical science", SPNI 4 "Translational medicine"

For citation: Voropaeva AV, Borsuk AD, Shevchenko NI, Martynenko SM. Determination of *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin in biopsy samples of gastric mucosa using TaqMan® MGB probes. *Health and Ecology Issues*. 2023;20(1):144–151. DOI: <https://doi.org/10.51523/2708-6011.2023-20-1-18>

Введение

Резистентность *H. pylori* к антибиотикам является основной причиной безуспешной эрадикации в клинической практике. Раннее выявление резистентности необходимо для выбора антибактериальных лекарственных средств и повышения эффективности лечения [1]. 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 г. в сочетании с амоксициллином или метронидазолом и обязательно с антисекреторными препаратами (ингибиторами протонного насоса, H₂-блокаторами). Наличие метоксигрупп-

пы в 6-й позиции лактонного кольца придает ему повышенную кислотостабильность и улучшенные по сравнению с эритромицином антибактериальные и фармакокинетические свойства [2]. Резистентность *H. pylori* к кларитромицину обусловлена главным образом заменой аденина на гуанин в позициях 2142 и 2143 и трансверсией аденина на цитозин в позиции 2142, которые включены в пептидилтрансферазный цикл 23S rRNA. Мутация А к Г в положении 2142 или в положении 2143 и мутация А к С в положении 2142 наиболее часто встречаются в резистентных штаммах *H. pylori* Европы и Азии и составляют 69,8, 11,7 и 2,6 % соответственно [3].

В регионах с низким уровнем резистентности к кларитромицину (< 15 %) тройная терапия: ин-

гибитор протонной помпы (ИПП), кларитромицин + амоксициллин и висмутсодержащая квадротерапия (ИПП + висмут + тетрациклин + метронидазол) рассматриваются в качестве схем первой линии и могут назначаться эмпирически [4, 5, 6].

«Золотым стандартом» определения чувствительности к антибиотикам являются фенотипические методы, применительно к *H. pylori* — метод разведения в агаре. Данный метод имеет существенные недостатки для применения в практической лаборатории обычной клиники: сложен в исполнении, трудоемок, требует опыта персонала, соответственно, существует потребность в независимых от получения культуры методах прогнозирования устойчивости к антибиотикам [7]. Разработанная в 1983 г. К. Мюллисом технология амплификации (многократного копирования) небольших количеств образцов дезоксирибонуклеиновой кислоты (ДНК) увеличивает количество копий исходной пробы в миллионы раз в течение нескольких часов [8] и позволяет не только выявлять искомую ДНК, но и проводить генотипирование и дальнейшее секвенирование (определение последовательности нуклеотидов в цепочке ДНК) [9]. Изучение молекулярного механизма устойчивости выявило множество мутаций, ответственных за развитие резистентности *H. pylori* к используемым для лечения лекарственным средствам и привело к разработке молекулярных тестов определения резистентности. Протокол TaqMan-зондов основан на выщеплении 5'-концевой метки с использованием 5'-экзонуклеазной активности полимеразы. В реакционную смесь добавляют ДНК-зонды, в состав которых входят флуоресцентная метка в 5'-положении, гаситель флуоресценции в 3'-положении, а также фосфатная группа в 3'-положении. Эти зонды имеют места посадки внутри амплифицируемой области. Гаситель поглощает испускаемое флуоресцентной меткой излучение, а фосфатная группа в 3'-положении блокирует полимеразу. При проведении ПЦР на стадии отжига праймеров ДНК-зонд присоединяется к комплементарной цепи ДНК, и чем больше образуется продуктов амплификации в ходе ПЦР, тем больше молекул зондов свяжется с соответствующими ампликонами. На стадии элонгации полимеразы синтезирует комплементарную цепь ДНК и при достижении зонда начинает его расщеплять благодаря наличию 5'-экзонуклеазной активности, в результате происходит разъединение флуоресцентной метки и гасителя и увеличение детектируемого свечения [10, 11]. В структуру TaqMan®-зонда входит связывающийся с малой бороздкой ДНК MGB (minor groove binder) фрагмент на 3' конце, который повышает температуру плавления зонда и стабилизирует гибрид

«зонд-мишень», благодаря чему TaqMan®-зонды могут быть гораздо короче обычных зондов, обеспечивая лучшую дискриминацию мишеней и возможность их большего выбора. Также в структуру TaqMan®-зондов включен нефлуоресцентный гаситель NFQ (Nonfluorescent quencher), поглощающий сигнал от флуоресцирующих красителей на другом конце пробы. Это свойство NFQ в сочетании с короткой длиной зондов с MGB снижает фоновый сигнал и приводит к повышению специфичности и точности полученных результатов [12, 13].

Цель исследования

Изучить первичную резистентность *H. pylori* к кларитромицину жителей Гомельской области методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с использованием TaqMan® MGB-зондов.

Материалы и методы

В исследование включено 184 пациента с диагнозом гастрита и дуоденита, K29, медиана возраста — 48,5 года (25 и 75 % — 37 и 61 год).

Согласно анкетным данным, эрадикационная терапия *H. pylori* с применением кларитромицина пациентам 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 3 суток [14]. Далее проводили выделение тотальной ДНК по разработанной методике с применением протеиназы К. С этой целью рекомендуемый производителем протокол выделения ДНК комплекта реагентов «ПРО-БА-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 часов. После выделения 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* (*cagH*), определение мутаций A2143G, A2142G (*HP23SRNA*), определение ВКО (внутреннего контрольного образца — *Rnase P*). Для выполнения исследования использовались синтезированные по нашему заказу праймеры и флуоресцентные зонды (таблица 1), а также премикс ArtMix ДНК полимеразы 2x производства ООО «АртБиоТех» (Республика Беларусь).

Таблица 1. Праймеры и зонды для ПЦР РВ
Table 1. Primer and probe sequences for PCR RT

Наименование гена	Наименование праймера и зонда, последовательность (5'-3')	Продукт (н. п.)	Генный банк, №
<i>RnaseP</i>	RnaseP-F 5'AGATTTGGACCTGCGAGCG 3' RnaseP-R 5'GAGCGGCTGTCTCCACAAGT 3' RnaseP-PHex - TTCTGACCTGAAGGCTCTGCGCG3' MGB	71	U77665.1
<i>cagH</i>	cagH-F 5' TTATGTTAGAAATCGCTTGAGTGCA3' cagH-R 5' CGCTTCTCAAATGATACTTAATCAATC3' cagH-P 5' FAM -AGGTGCTAGTAGCTAATC3' MGB	98	FR666857.1
<i>23SrRNA</i>	HP23S- F 5'TTCAGTGAAATTGTAGTGGAGGTG3' HP23S-R5' TCCCATTAGCAGTGCTAAGTTGTA3' HP23S-AA 5' FAM -AGACGGAAAGACC3' MGB HP23S-GA5' HEX -AGACGGGAAGACC3' MGB HP23S-AG 5' HEX -AGACGGGAGAGACC3' MGB	98	NR076155.1

Смесь реагентов для амплификации гена *cagH* и *Rnase P* состояла из 10,0 мкл премикс ArtMix ДНК полимеразы 2x, 2 мкл смеси праймеров, 0,8 мкл зонда и деионизованной воды до объема 15 мкл, образец ДНК — 5 мкл. Смесь реагентов для амплификации гена *23SRNA* состояла из 10,0 мкл премикс ArtMix ДНК полимеразы 2x, 2 мкл смеси праймеров, 2,4 мкл смеси зондов и деионизованной воды до объема 15 мкл, образец ДНК — 5 мкл. Концентрация каждого праймера и зонда составляет 10,0 пмоль/мкл. Программа амплификации включала: 95 °C — 2 минуты (1 цикл); 95 °C — 15 секунд, 60 °C — 45 секунд (40 циклов) → считывание сигнала в конце каждого цикла [15]. Дополнительно в постановку включали ОКО (отрицательный образец, дистиллированная вода), предназначенный для выявления артефактов в ходе реакции, и постановку НТС (холостой пробы). Также в постановку включали ПКО (заведомо положительные образцы по каждому из 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). Образец считали положительным, если в таблице результатов пороговых циклов по детектируемому каналу определено значение *Ct* 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 HEX для *Rnase P* — выявлен фрагмент

гена *Rnase P* (ВКО) — образец подлежит дальнейшему анализу; наличие характерной кривой по каналу детекции FAM для *cagH* — выявлена ДНК *H. pylori*; наличие характерной кривой по каналу детекции FAM для *23SrRNA* — резистентность к кларитромицину отсутствует; наличие характерной кривой по каналу детекции HEX для *23SrRNA* — выявлена резистентность к кларитромицину.

Наличие характерных кривых хотя бы по одному из детектируемых каналов (FAM, HEX) в образцах ОКО и НТС свидетельствует о загрязнении реакционной смеси или расходных материалов (ложноположительные образцы, постановка некорректна). Отсутствие характерного роста кривой по каналу HEX для *RnaseP* (ВКО) свидетельствует об ингибировании ПЦР или недостаточном количестве биологического материала (ложноотрицательные образцы, не подлежат учету).

Статистический анализ

Результаты представлены в виде частоты резистентности к конкретному гену (в процентах).

Результаты и обсуждение

Все исследуемые образцы ДНК являлись положительными по гену *Rnase P* (ВКО) и учитывались при дальнейшем анализе (*Ct*, HEX 20,20–34,14). Заведомо положительные контрольные пробы имели характерный рост кривых по соответствующим каналам детекции, в заведомо отрицательных — рост кривых не отмечен. ДНК гена *cagH* (*Ct*, FAM 21,26–33,04), свидетельствующая об инфицировании бактерией, подтверждена в 152 образцах (82,6 %) (рисунок 1).

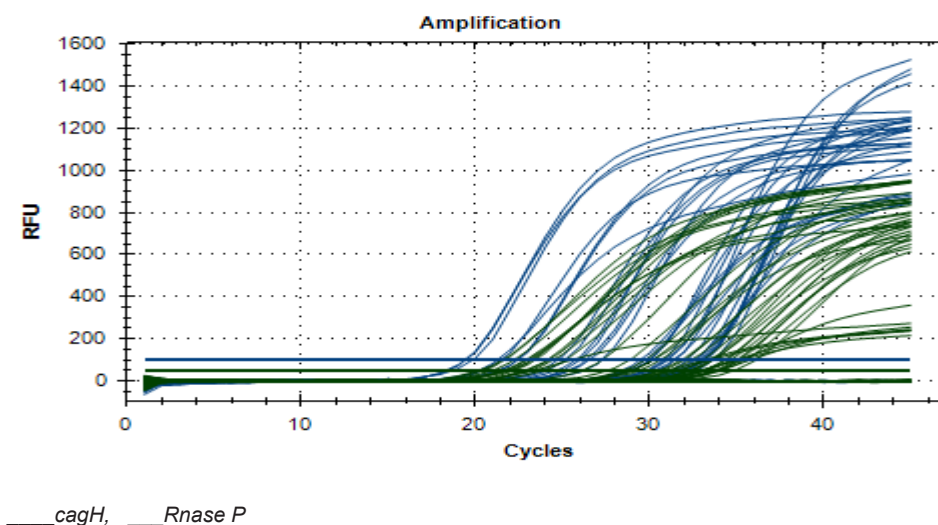


Рисунок 1. Кинетические кривые анализа гена cagH и Rnase P
 Figure 1. Kinetic curves of cagH and Rnase P gene analysis

ДНК гена 23SrRNA (точечные мутации A2142G и A2143G) выявлена в 16 из 152 образцов ДНК. Резистентность *H. pylori* к кларитро-

мицину составила 10,5 % (Ct, Hex 20,24-31,17) (рисунок 2).

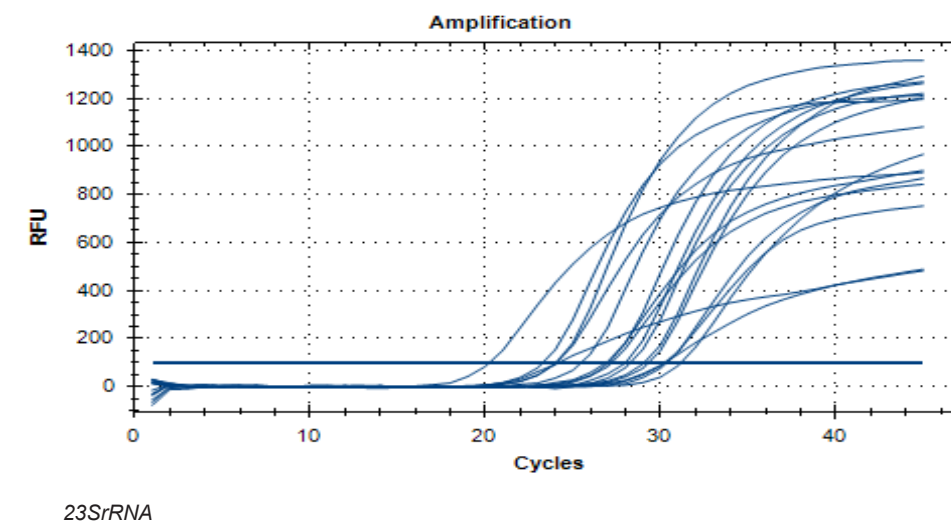


Рисунок 2. Кинетические кривые анализа гена 23SrRNA
 Figure 2. Kinetic curves of 23SrRNA gene analysis

Тройная эрадикационная терапии первой линии, включающая ИПП, амоксициллин и кларитромицин, в течение 7–10 дней (1996 г.) являлась успешной у 80 % пациентов, и данная схема применялась повсеместно [16], снизившись с течением времени до 60 %, и прямо коррелирующей с возросшей резистентностью к кларитромицину [17, 18]. Результаты многоцентровых исследований показали, что при наличии чувствительности к препарату эффективность эрадикации составляет почти 88 %, а развитие резистентности к

кларитромицину понижает ее до 18,3 % [19]. В настоящее время стандартная тройная терапия эффективна (более 90 %) в регионах, где уровень резистентности к кларитромицину не превышает 10 % [20], однако к 2013 г. резистентность во многих странах превысила критические 20 % [21]. Следует отметить, что зарегистрированный нами ранее (2006–2012 гг.) уровень первичной резистентности к кларитромицину в Гомельской и Витебской области составлял 5,2 % [22].

В рекомендациях Маастрихт VI отображены стратегии по повышению эффективности существующих схем эрадикационной терапии: увеличение продолжительности лечения тройной терапией до 14 дней; использование более высоких доз ИПП или вонопрозана (калий-конкурентный блокатор секреции соляной кислоты); использование схемы из четырех препаратов; добавление пробиотиков [6]. Механизмы устойчивости *H. pylori* к антибиотикам в настоящее время в значительной степени изучены. Выявить резистентность к антибиотикам возможно путем обнаружения различных мутаций или других генетических изменений, и корреляция между генотипами и фенотипами может быть как относительно простой (прямо пропорциональной, например, для кларитромицина и фторхинолонов), так и очень сложной (например, для метронидазола). Точность методов молекулярной диагностики для прогнозирования устойчивости к антибиотикам сильно различается между различными антибиотиками, но устойчивость к кларитромицину, лишь за очень немногими исключениями, возникает из-за мутаций в гене 23S рРНК, главными из которых являются A2143G, A2142G и A2142C. Так как данные мутации отвечают почти за всю клиническую резистентность, ПЦР или секвенирование обоснованы и применимы для определения резистентности к кларитромицину [6, 23].

Заключение

Первичная резистентность *H. pylori* к кларитромицину в Гомельской области составила 10,5 %, и применение тройной эрадикационной терапии первой линии, включающей ИПП, амоксициллин и кларитромицин, в качестве эмпирической в данном регионе, согласуется с рекомендациями Маастрихт III-VI и постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 01.06.2017 № 54: клинический протокол «Диагностика и лечение пациентов с заболеваниями органов пищеварения».

Современные молекулярные методы, такие как ПЦР и особенно ПЦР РВ, секвенирование, в практике клинических лабораторий должны быть направлены на определение резистентности в конкретном регионе, что обеспечит целесообразность использования лекарственных средств, а также позволит проводить динамическое наблюдение за уровнем резистентности, назначать индивидуализированную эрадикационную терапию. Метод ПЦР РВ с использованием TaqMan® MGB-зондов характеризуется высокой чувствительностью и специфичностью, стандартизован, что особенно важно при ко-инфекциях с устойчивыми и чувствительными к кларитромицину штаммами, непродолжителен по времени и соответствует рекомендованным Маастрихт VI методам определения резистентности *H. pylori* к кларитромицину.

Список литературы

1. Андреев ДН, Маев ИВ, Кучерявый ЮА. Резистентность *Helicobacter pylori* в Российской Федерации: метаанализ исследований за последние 10 лет. *Терапевтический архив*. 2020;92(11):24-30. DOI: <https://doi.org/10.26442/00403660.2020.11.000795>
2. Дехнич НН, Козлов СН. Кларитромицин (Клацид) – роль в эрадикации *Helicobacter pylori*-инфекции. *Фарматека*. 2007;(13):1-6.
3. Nishizawa T, Suzuki H. Mechanisms of *Helicobacter pylori* antibiotic resistance and molecular testing. *Front Mol Biosci*. 2014;1:19. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00019>
4. Диагностика и лечение пациентов с заболеваниями органов пищеварения: клинический протокол [Электронный ресурс]: постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь, 01 июня 2017 г., № 54, приложение 2. [дата доступа: 20.12.2022]. Режим доступа: <https://minzdrav.gov.by/upload/dadvfiles/СПротокол/КП%20Диагностика%20и%20лечение%20пациентов%20с%20заболеваниями%20органов%20пищеварения%2001.06.2017%20№%2054.pdf>
5. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Gisbert JP, Kuipers EJ, et al. European *Helicobacter* and Microbiota Study Group and Consensus panel. Management of *Helicobacter pylori* infection—the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut*. 2017 Jan;66(1):6-30. DOI: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312288>
6. Malfertheiner P, Megraud F, Rokkas T, Gisbert JP, Liou JM, et al. European *Helicobacter* and Microbiota Study group. Management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht VI/Florence consensus report. *Gut*. 2022 Aug 8;gutjnl-2022-327745. DOI: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-327745>
7. Allahverdiyev AM, Bagirova M, Caliskan R, Tokman NB, Aliyeva H, et al. Isolation and diagnosis of *Helicobacter pylori* by a new method: microcapillary culture. *World J Gastroenterol*. 2015 Mar 7;21(9):2622-2628. DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i9.2622>
8. Волков АН, Начева ЛВ. Молекулярно-генетические методы в практике современных медико-биологических исследований. Часть I: теоретические основы ПЦР-диагностики. *Фундаментальная и клиническая медицина*. 2020;5(4):133-140. DOI: <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-4-133-140>
9. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics*. 2016 Jan;107(1):1-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>
10. Ребриков ДВ, Саматов ГА, Трофимов ДЮ, [и др.]. ПЦР в реальном времени. Под ред. Д. В. Ребрикова. 9-е изд. Москва: Лаборатория знаний; 2021. 223 с.
11. Nagy A, Vitásková E, Černíková L, Křivda V, Jiřincová H, et al. Evaluation of TaqMan qPCR System Integrating Two Identically Labelled Hydrolysis Probes in Single Assay. *Sci Rep*. 2017 Jan 25;7:41392. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep41392>
12. Kutyavin I, Lokhov S, Lukhtanov E, Reed MW. Chemistry of minor groove binder-oligonucleotide conjugates. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem*. 2003 Aug; Chapter 8:Unit 8.4. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471142700.nc0804s13>
13. Qiu J, Wilson A, El-Sagheer AH, Brown T. Combination probes with intercalating anchors and proximal fluorophores for DNA and RNA detection. *Nucleic Acids Res*. 2016 Sep 30;44(17):e138. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw579>

14. Организация работы при исследованиях методом ПЦР материала, инфицированного патогенными биологическими агентами III-IV групп патогенности. Методические указания МУ 1.3.1794-03, МУ 1.3.1794-04. Минздрав России; 2003. Приложение 7. [дата обращения: 10.11.2022]. Режим доступа: <https://docs.cntd.ru/document/1200035464>

15. Peng X, Song Z, He L, Lin S, Gong Y, et al. Gastric Juice-Based Real-Time PCR for Tailored. *Helicobacter Pylori Treatment: A Practical Approach. Int J Med Sci.* 2017 May 15;14(6):595-601. DOI: <https://doi.org/10.7150/ijms.18996>

16. Current European concepts in the management of Helicobacter pylori infection. The Maastricht Consensus Report. European Helicobacter Pylori Study Group. *Gut.* 1997 Jul;41(1):8-13. DOI: <https://doi.org/10.1136/gut.41.1.8>

17. Graham DY, Lee YC, Wu MS. Rational Helicobacter pylori therapy: evidence-based medicine rather than medicine-based evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2014 Feb;12(2):177-86.e3; Discussion e12-3. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.05.028>

18. McNicholl AG, Marin AC, Molina-Infante J, Castro M, Barrio J, et al. Randomised clinical trial comparing sequential and concomitant therapies for Helicobacter pylori eradication in routine clinical practice. *Gut.* 2014 Feb;63(2):244-249. DOI: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-304820>

19. Mégraud F. H pylori antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut.* 2004 Sep;53(9):1374-1384. DOI: <https://doi.org/10.1136/gut.2003.022111>

20. Taguchi H, Kanmura S, Maeda T, Iwaya H, Arima S, Sasaki F, Nasu Y, Tanoue S, Hashimoto S, Ido A. Helicobacter pylori eradication improves the quality of life regardless of the treatment outcome: A multicenter prospective cohort study. *Medicine (Baltimore).* 2017 Dec;96(52):e9507. DOI: <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000009507>

21. Поздеева АО, Поздеев ОК, Гуляев ПЕ, Валева ЮБ, Савинова АН. Современное развитие схем эрадикации Helicobacter pylori. *Инфекция и иммунитет.* 2021;11(6):1037-1049. DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-CDO-1679>

22. Воропаева АВ, Воропаев ЕВ, Баранов ОЮ, Платошкин ЭН, Шафранский АА. Молекулярно-генетическое тестирование мутаций гена 23S рРНК *H.pylori*, определяющих резистентность к кларитромицину. *Медико-биологические проблемы жизнедеятельности.* 2010;(4):30-35.

23. Mestrovic A, Perkovic N, Tonkic A, Sundov Z, Kumric M, Bozic J. Personalized Approach in Eradication of Helicobacter pylori Infection. *Antibiotics (Basel).* 2022 Dec 21;12(1):7. DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010007>

References

1. Andreev DN, Maev IV, Kucheryavyy 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. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.26442/00403660.2020.11.000795>

2. Dekhnich NN, Kozlov SN. Clarithromycin (Klacid) - a role in the eradication of Helicobacter pylori infection. *Pharmateka.* 2007;(13):1-6. (In Russ.).

3. Nishizawa T, Suzuki H. Mechanisms of Helicobacter pylori antibiotic resistance and molecular testing. *Front Mol Biosci.* 2014;1:19. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00019>

4. Диагностика и лечение пациентов с заболеваниями органов пищеварения: клинический протокол [Электронный ресурс]: постановление Министерства здравоохранения Республики Беларусь, 01 июня 2017 г., № 54, приложение 2. [date of access: 10.11.2022]. Available from: <https://minzdrav.gov.by/upload/dadvfiles/СПротокол/КП%20Диагностика%20и%20лечение%20пациентов%20с%20заболеваниями%20органов%20пищеварения%2001.06.2017%20№%2054.pdf> (In Russ.).

5. Malfertheiner P, Megraud F, O'Morain CA, Gisbert JP, Kuipers EJ, et al. European Helicobacter and Microbiota Study Group and Consensus panel. Management of Helicobacter pylori infection-the Maastricht V/Florence Consensus Report. *Gut.* 2017 Jan;66(1):6-30. DOI: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2016-312288>

6. Malfertheiner P, Megraud F, Rokkas T, Gisbert JP, Liou JM, Schulz C, Gasbarrini A, Hunt RH, Leja M, O'Morain C, Rugge M, Suerbaum S, Tilg H, Sugano K, El-Omar EM; European Helicobacter and Microbiota Study group. Management of Helicobacter pylori infection: the Maastricht VI/Florence consensus report. *Gut.* 2022 Aug 8;gutjnl-2022-327745. DOI: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-327745>

7. Allahverdiyev AM, Bagirova M, Caliskan R, Tokman HB, Aliyeva H, et al. Isolation and diagnosis of Helicobacter pylori by a new method: microcapillary culture. *World J Gastroenterol.* 2015 Mar 7;21(9):2622-2628. DOI: <https://doi.org/10.3748/wjg.v21.i9.2622>

8. Volkov AN, Nacheva LV. Molecular genetic techniques in current biomedical research. Part I: Theoretical basis of PCR-diagnostics. *Fundamental and Clinical Medicine.* 2020;5(4):133-140. (In Russ.). DOI: <https://doi.org/10.23946/2500-0764-2020-5-4-133-140>

9. Heather JM, Chain B. The sequence of sequencers: The history of sequencing DNA. *Genomics.* 2016 Jan;107(1):1-8. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2015.11.003>

10. Rebrikov DV, Samatov GA, Trofimov DYU, et al. Real-time PCR. Moscow: Laboratory of knowledge; 2021. 223 p. (In Russ.).

11. Nagy A, Vitásková E, Černíková L, Krivdová V, Jiřincová H, et al. Evaluation of TaqMan qPCR System Integrating Two Identically Labelled Hydrolysis Probes in Single Assay. *Sci Rep.* 2017 Jan 25;7:41392. DOI: <https://doi.org/10.1038/srep41392>

12. Kutyavin I, Likhov S, Lukhtanov E, Reed MW. Chemistry of minor groove binder-oligonucleotide conjugates. *Curr Protoc Nucleic Acid Chem.* 2003 Aug; Chapter 8:Unit 8.4. DOI: <https://doi.org/10.1002/0471142700.nc0804s13>

13. Qiu J, Wilson A, El-Sagheer AH, Brown T. Combination probes with intercalating anchors and proximal fluorophores for DNA and RNA detection. *Nucleic Acids Res.* 2016 Sep 30;44(17):e138. DOI: <https://doi.org/10.1093/nar/gkw579>

14. Organization of work during PCR studies of material infected with pathogenic biological agents of pathogenicity groups III-IV / Guidelines MU 1.3.1794-03, MU 1.3.1794-04. Ministry of Health of Russia.; 2003. Appendix 7. [date of access: 10.11.2022]. Available from: <https://docs.cntd.ru/document/1200035464> (In Russ.).

15. Peng X, Song Z, He L, Lin S, Gong Y, et al. Gastric Juice-Based Real-Time PCR for Tailored. *Helicobacter Pylori Treatment: A Practical Approach. Int J Med Sci.* 2017 May 15;14(6):595-601. DOI: <https://doi.org/10.7150/ijms.18996>

16. Current European concepts in the management of Helicobacter pylori infection. The Maastricht Consensus Report. European Helicobacter Pylori Study Group. *Gut.* 1997 Jul;41(1):8-13. DOI: <https://doi.org/10.1136/gut.41.1.8>

17. Graham DY, Lee YC, Wu MS. Rational Helicobacter pylori therapy: evidence-based medicine rather than medicine-based evidence. *Clin Gastroenterol Hepatol.* 2014 Feb;12(2):177-86.e3; Discussion e12-3. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.cgh.2013.05.028>

18. McNicholl AG, Marin AC, Molina-Infante J, Castro M, Barrio J, et al. Randomised clinical trial comparing sequential and concomitant therapies for Helicobacter pylori eradication in routine clinical practice. *Gut.* 2014 Feb;63(2):244-249. DOI: <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2013-304820>

19. Mégraud F. H pylori antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut*. 2004 Sep;53(9):1374-1384.
DOI: <https://doi.org/10.1136/gut.2003.022111>
20. Taguchi H, Kanmura S, Maeda T, Iwaya H, Arima S, Sasaki F, Nasu Y, Tanoue S, Hashimoto S, Ido A. Helicobacter pylori eradication improves the quality of life regardless of the treatment outcome: A multicenter prospective cohort study. *Medicine (Baltimore)*. 2017 Dec;96(52):e9507.
DOI: <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000009507>
21. Pozdeeva AO, Pozdeev OK, Gulyaev PE, Valeeva YuV, Savinova AN. Current development of Helicobacter pylori eradication protocols. *Russian Journal of Infection and Immunity*. 2021;11(6):1037-1049. (In Russ.).
DOI: <https://doi.org/10.15789/2220-7619-CDO-1679>
22. Voropaeva AV, Voropaev EV, Baranov OYu, Platoshkin E.H, et al. Molecular genetic testing of mutations of the H.pylori 23S rRNA gene that determine resistance to clarithromycin. *Biomedical problems of vital activity*. 2010;(4):30-35. (In Russ.).
23. Mestrovic A, Perkovic N, Tonkic A, Sundov Z, Kumric M, Bozic J. Personalized Approach in Eradication of Helicobacter pylori Infection. *Antibiotics (Basel)*. 2022 Dec 21;12(1):7.
DOI: <https://doi.org/10.3390/antibiotics12010007>

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

Борсук Алексей Дмитриевич, заведующий отделением, врач-эндоскопист, ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», Гомель, Беларусь

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6589-8796>

e-mail: borsuk@mail.ru

Шевченко Наталья Ивановна, к.б.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

Мартыненко Светлана Михайловна, биолог лаборатории клеточных технологий, ГУ «Республиканский научно-практический центр радиационной медицины и экологии человека», Гомель, Беларусь

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4778-8010>

e-mail: svemartyn65@mail.ru

Alla V. Voropaeva, Candidate of Biological Sciences, Associate Professor, Physician of Clinical Laboratory Diagnostics of Republican Scientific and Practical Center for Radiation Medicine and Human Ecology

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

e-mail: allo4ka3665@mail.ru

Alexey D. Borsuk, Head of the Department, Endoscopist, Republican Scientific and Practical Center for Radiation Medicine and Human Ecology

ORCID: <http://orcid.org/0000-0001-6589-8796>

e-mail: borsuk@mail.ru

Natalia I. Shevchenko, Candidate of Biological Science, Head of the Cell Technology Laboratory at the Republican Scientific and Practical Center for Radiation Medicine and Human Ecology

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

e-mail: shevchenkoni@bk.ru

Sviatlana M. Martynenko, Biologist in the Laboratory of Cell Technologies at the Republican Scientific and Practical Center for Radiation Medicine and Human Ecology

ORCID: <http://orcid.org/0000-0003-4778-8010>

e-mail: svemartyn65@mail.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 10.01.2023

Поступила после рецензирования / Accepted 01.02.2023

Принята к публикации / Revised 28.02.2023