



Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России

Учредители:

Синопальников А.И.; Пискунов Г.Г.; Козлов Р.С.; Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ)

Главный редактор:
Синопальников А.И.

Адрес редакции:

214019, Смоленская обл., г. Смоленск, ул. Кирова, д. 46А
Эл. почта: info@cmac-journal.ru

Адрес для корреспонденции:

214019, г. Смоленск, а/я 5.
Тел./факс: +7(4812)45-06-02

Издатель МАКМАХ:

214019, г. Смоленск, ул. Кирова 46А, www.iacsmc.ru

Адрес типографии:

214020, Россия, г. Смоленск, ул. Смольянинова, д. 1

Электронная версия журнала:

https://cmac-journal.ru

Подписка на сайте издателя:

https://service.iacsmc.ru

Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор).

Запись в реестре зарегистрированных СМИ: ПИ № ФС 77 – 86269 от 27.11.2023

Не распространяется через предпринятия связи
Тираж 3000 экз.

Свободная цена

Дата выхода – 28.01.2025

Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук

Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование

Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов

Ответственность за достоверность рекламных публикаций несут рекламодатели

При перепечатке ссылка на журнал обязательна

Журнал является научным изданием для врачей, в связи с чем на него не распространяются требования Федерального закона от 29.12.2010 №436-ФЗ «О защите детей от информации, причиняющей вред их здоровью и развитию»

Иллюстрация для обложки предоставлена: Ольга Николаевна Пинегина (ФГБУ «НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России)

© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2024.

Содержание

Болезни и возбудители

Козлов Р.С., Каприн А.Д., Андреева И.В., Зикиряходжаев А.Д., Власова М.Ю., Дехнич А.В., Довгань Е.В., Коваленко Т.Н., Михайлов С.И., Стецюк О.У.

- 245** Практические рекомендации по применению антибиотиков при хирургии молочной железы: антибиотикопрофилактика и лечение инфекций области хирургического вмешательства и имплант-ассоциированных инфекций

Мацвай А.Д., Безруков В.М., Николаева П.А., Стеценко И.Ф., Нурмуханова В.А., Дикая Г.С., Гордукова М.А., Галеева Е.В., Шипулин Г.А.

- 275** Опыт культивирования и молекулярно-генетическая характеристика полных геномов *Mycoplasma pneumoniae*, изолированных в России

Белякова Е.Н., Шипулин Г.А.

- 286** Оспа обезьян: эпидемиологическая ситуация, диагностика, профилактика, новые вызовы и проблемы современности

Антимикробные препараты

Рачина С.А., Федина Л.В., Стафеев А.Н., Кремнева А.О., Дехнич А.В.

- 302** Цефтобиол медокарил: клинико-фармакологическая характеристика и возможности клинического применения

Агеевец В.А.

- 311** Вторая жизнь полимиксинов

Козлов Р.С., Иванчик Н.В., Микотина А.В., Дехнич А.В.

- 318** *In vitro* активность макролидных антибиотиков в отношении *Streptococcus pneumoniae* и *Streptococcus pyogenes* в Российской Федерации: «Status praesens»

Антибиотикорезистентность

Козлов Р.С., Палагин И.С., Иванчик Н.В., Трушин И.В., Дехнич А.В., Эйдельштейн М.В., Перепанова Т.С., и исследовательская группа «ДАРМИС-2023»

- 328** Национальный мониторинг антибиотикорезистентности возбудителей внебольничных инфекций мочевых путей в России: результаты многоцентрового эпидемиологического исследования «ДАРМИС-2023»

Шагабиева Ю.З., Шпилева М.В., Лагун К.М., Охлопкова О.В., Плахова К.И., Носов Н.Ю.

- 338** Генетическое разнообразие и антибиотикорезистентность *Neisseria gonorrhoeae* в России за период 2022–2023 гг.

Ни О.Г., Шифман Е.М., Яковлев С.В., Быков А.О., Горбачева А.А., Круглов А.Н., Белоцерковский Б.З., Матюшков Н.С., Галата А.А., Проценко Д.Н.

- 345** Распространенность носительства генов, детерминирующих продукцию карбапенемаз, у пациентов, госпитализированных в Московский многопрофильный стационар

Эйдельштейн И.А., Гушин А.Е., Гладин Д.П., Романов А.В., Негашева Е.С., Фриго Н.В., Козлов Р.С., Потеев Н.Н., Козлова Н.С., Борухович Д.Г.

- 356** Высокая распространенность резистентности к макролидам и фторхинолонам у *Mycoplasma genitalium*, выделенных у пациентов из двух мегаполисов России – Москвы и Санкт-Петербурга в 2021–2024 гг.

Опыт работы

Рыбалкина Т.Н., Каражас Н.В., Корниенко М.Н., Аветисян Л.Р., Бошняк Р.Е., Пульнова Н.Л., Кабикова О.Ф., Иванова М.Ю., Черешнева Е.В.

- 370** Участие *Pneumocystis jirovecii* в инфекционной и соматической патологии детей и взрослых при иммуносупрессии различного генеза

Старкова Д.А., Гладышев Н.С., Полев Д.Е., Егорова С.А., Сварваль А.В.

- 378** Мутации в гене 23S rRNA, ассоциированные с устойчивостью к кларитромицину клинических изолятов *Helicobacter pylori* в Санкт-Петербурге

Лямин А.В., Исмагуллин Д.Д., Козлов А.В., Алексеев Д.В., Каюмов К.А., Бочкарёва П.В., Антипов В.А., Железнова А.И.

- 384** Межприборное сравнение аналитической чувствительности автоматических микробиологических анализаторов гемокультур

Мутации в гене 23S рРНК, ассоциированные с устойчивостью к кларитромицину клинических изолятов *Helicobacter pylori* в Санкт-Петербурге

Старкова Д.А., Гладышев Н.С., Полев Д.Е., Егорова С.А., Сварваль А.В.

ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера» Роспотребнадзора, Санкт-Петербург, Россия

Контактный адрес:

Дарья Андреевна Старкова

Эл. почта: dariastarkova13@gmail.com

Ключевые слова: *H. pylori*, лекарственная устойчивость, мутации, A2146G, A2147G, 23S рРНК, кларитромицин.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

Цель. Выявление точечных мутаций в гене 23S рРНК, ассоциированных с фенотипической лекарственной устойчивостью к кларитромицину (CLR) клинических изолятов *Helicobacter pylori*.

Материалы и методы. Изучены 50 изолятов *H. pylori*, выделенных от взрослых пациентов с хроническим гастритом (n = 36), язвенной болезнью 12-перстной кишки (n = 13) и раком желудка (n = 1) в период с 2014 по 2022 г. Из 50 изолятов 30 были получены от впервые выявленных больных, 20 – от ранее леченых. Культивирование *H. pylori* осуществляли на обогащенном колумбийском агаре и инкубировали в микроаэрофильных условиях (GasPak 100). Чувствительность изолятов *H. pylori* к кларитромицину определяли диско-диффузионным методом. Продукты амплификации гена 23S рРНК (1402 п. н.) секвенировали по Сэнгеру. Обработка хроматограмм, выравнивание сиквенсов на референсную последовательность *H. pylori* 26695 и идентификация нуклеотидных замен выполнены с использованием программы Unipro UGENE v.38.1.

Результаты. Оценка результатов определения чувствительности 50 изолятов *H. pylori* показала, что 30 изолятов являлись CLR-устойчивыми, 20 – CLR-чувствительными. Точечная мутация A2147G была обнаружена у 17 (56,7%) CLR-устойчивых изолятов и лишь у одного (5,0%) CLR-чувствительного изолята (p = 0,0002). Мутация A2146G выявлена у 13,3% (4/30) CLR-устойчивых изолятов (p = 0,14). Ни один из CLR-устойчивых изолятов не являлся носителем одновременно двух мутаций A2146G/A2147G, в то время как 9 (30,0%) не имели ни одной мутации. Таким образом, совпадение генотипической и фенотипической устойчивости к кларитромицину на основании присутствия мутаций A2146G + A2147G составило 70,0%. Все клинические изоляты, полученные от ранее леченых больных (n = 20), принадлежали к группе CLR-устойчивых. Из них 16 (80,0%) являлись носителями мутаций A2146G или A2147G, тогда как в группе впервые выявленных больных (n = 30) лишь 5 изолятов (16,7%) являлись носителями одной из двух мутаций (p = 0,003). Помимо точечных замен в позициях 2146/2147, нами были выявлены одонуклеотидные замены G1567T, C1568A/T, A1825G, G1830A, T1834C, T2186C, однако без ассоциации с фенотипической лекарственной устойчивостью (p > 0,05).

Выводы. Наше исследование показало, что из всех вариантов нуклеотидных замен в гене 23S рРНК, только одна (A2147G) ассоциирована с фенотипической лекарственной устойчивостью клинических изолятов *H. pylori* к кларитромицину. Несмотря на низкую частоту встречаемости точечной мутации A2146G, детекция комбинированной мутации A2146G/A2147G может служить предиктором фенотипической устойчивости клинических изолятов *H. pylori*.

Original Article

Mutations in 23S rRNA gene associated with clarithromycin resistance in *Helicobacter pylori* clinical isolates from Saint-Petersburg

Starkova D.A., Gladyshev N.S., Polev D.E., Egorova S.A., Svarval A.V.

Saint-Petersburg Pasteur Institute, Saint-Petersburg, Russia

Contacts:

Daria A. Starkova

E-mail: dariastarkova13@gmail.com

Key words: *H. pylori*, drug resistance, mutations, A2146G, A2147G, 23S rRNA, clarithromycin.

Objective. To identify point mutations in 23S rRNA gene associated with phenotypic drug resistance to clarithromycin (CLR) in clinical isolates of *H. pylori*.

Materials and methods. A total of 50 *H. pylori* clinical isolates (2014–2022) from adult patients with chronic gastritis (n = 32), duodenal ulcer (n = 11) and gastric cancer (n = 1) were included in this study. Of 50 isolates, 30 were obtained from newly diagnosed patients, 20 – from previously treated patients after eradication failure. All isolates were cultured on supplemented Columbia agar and incubated under microaerophilic conditions (GasPak 100). Antibiotic susceptibility testing was performed by disc diffusion method. The PCR products (1402 bp) of the 23S rRNA gene were sequenced by Sanger approach. The DNA sequences were compared to the *H. pylori* 26695 reference using Unipro UGENE v.38.1.

Старкова Д.А. и соавт.

Conflicts of interest: all authors report no conflicts of interest relevant to this article.

External funding source: no external funding received.

Results. A total of 30 *H. pylori* isolates were determined as CLR-resistant and 20 isolates as CLR-susceptible. The A2147G point mutation was detected in 17 (56,7%) CLR-resistant isolates and one (5,0%) CLR-sensitive isolate ($p = 0,0002$). The other point mutation A2146G was found exclusively in 13,3% (4/30) of CLR-resistant isolates ($p = 0,14$). None of the CLR-resistant isolates carried two A2146G/A2147G mutations simultaneously, whereas 9 (30,0%) had neither of them. The agreement between genotypic and phenotypic susceptibility to CLR based on both A2146G + A2147G mutations was 70,0%. All clinical isolates obtained from previously treated patients ($n = 20$) were assigned to CLR-resistant group. Of these, 16 (80,0%) carried either A2146G or A2147G mutations, while among newly diagnosed patients ($n = 30$) only 5 isolates (16,7%) had one of two mutations ($p = 0,003$). The other point mutations out of 2146–2147 positions identified were G1567T, C1568A/T, A1825G, G1830A, T1834C, T2186C, but with no association with phenotypic drug resistance ($p > 0,05$).

Conclusions. Our study showed that among all variants of nucleotide substitutions in 23S rRNA gene, the only one (A2147G) is significantly associated with phenotypic resistance of *H. pylori* to CLR. Despite the low frequency of A2146G point mutation, combination of A2146G/A2147G mutations can be used as a predictor of phenotypic resistance of Russian *H. pylori* clinical isolates.

Введение

Helicobacter pylori колонизирует слизистую оболочку желудка более чем у 50% населения мира, однако лишь у 20% инфицированных развиваются заболевания желудочно-кишечного тракта (хронический гастрит, язва желудка и 12-перстной кишки, MALT-лимфома, рак желудка) [1].

Во всем мире используются различные схемы эрадикационной терапии *H. pylori*-инфекции, при этом выбор стратегии эрадикации определяется региональными показателями резистентности возбудителя к антибактериальным препаратам [2].

По данным метаанализа, обобщившего исследования антибиотикорезистентности *H. pylori* в различных регионах России за 10 лет (2011–2020 гг.), устойчивость к кларитромицину составила 10,4%, что свидетельствует о ее низком уровне (<15%) и позволяет рассматривать тройную схему эрадикационной терапии (кларитромицин + ингибитор протонной помпы + амоксициллин) в качестве первой линии в нашей стране [3]. Однако, по данным европейского регистра ведения инфекции *H. pylori* Hp-EuReg, устойчивость *H. pylori* к кларитромицину в России составляет 24%, что ставит под сомнение адекватность применения первой линии [4]. В связи с тем, что рутинное определение антибиотикорезистентности в клинической практике в настоящее время не представляется возможным, необходимо учитывать, что эмпирический подход при выборе схемы антибиотикотерапии в значительной степени способствует развитию резистентности к макролидам и появлению штаммов с множественной лекарственной устойчивостью. Все это диктует необходимость проведения полномасштабного исследования антибиотикорезистентности *H. pylori* в нашей стране.

Механизм действия кларитромицина заключается в связывании со II и V доменами 23S рРНК 50S субъединицы рибосомы, что приводит к последующей диссоциации пептидил-тРНК от рибосомы и остановке формирования полипептидной цепи [5, 6]. В настоящее время большинством исследований показано, что устой-

чивость к кларитромицину штаммов *H. pylori* обусловлена точечными мутациями в области домена V гена 23S рРНК – A2142G/С и A2143G (согласно нумерации Taylor и соавт.), приводящими к локальному повреждению пептидилтрансферазы. Вместе с тем, выявлено большое количество других мутаций в гене 23S рРНК, наличие которых у кларитромицинорезистентных штаммов носит противоречивый характер [7].

В российской литературе представлено лишь несколько публикаций, посвященных выявлению генетических маркеров антибиотикорезистентности в геноме *H. pylori*. В связи с этим **целью** нашей работы явилось выявление точечных мутаций в гене 23S рРНК, ассоциированных с фенотипической устойчивостью к кларитромицину клинических изолятов *H. pylori*.

Материалы и методы

Изучены 50 клинических изолятов *H. pylori*, выделенных от взрослых пациентов с хроническим гастритом ($n = 36$), язвенной болезнью 12-перстной кишки ($n = 13$) и раком желудка ($n = 1$) за период с 2014 по 2022 г. в ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера». Средний возраст пациентов составлял $44 \pm 4,5$ года (22–70 лет). При этом 30 изолятов были получены от впервые выявленных больных, 20 – от ранее леченых.

Исследование одобрено независимым локальным этическим комитетом ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (протокол №50/04-2019 от 22.06.2020).

Бактериологическому исследованию подлежали биоптаты слизистой оболочки антрального отдела желудка, которые были взяты во время эндоскопии в асептических условиях и помещались в пробирки с тиогликолевой средой для контроля стерильности. Культивирование *H. pylori* осуществляли на селективной среде на основе Колумбийского агара (с добавлением 5–7% дефибрированной лошадиной крови и

1% раствора IsoVitalex) при 37°C. Для подавления роста микробиоты использовались антибиотические добавки: ванкомицин для подавления роста грамположительных кокков, триметоприм – для грамотрицательных палочек, амфотерицин В – для грибов. Посевы инкубировали в микроаэрофильных условиях (содержание кислорода ~5%) с использованием газогенерирующих пакетов GasPak 100 (BD Biosciences, США). Сроки формирования колоний при первичном высеве – 3–4 суток. Колонии *H. pylori* использовали для приготовления мазков и окраски по Граму (тонкие изогнутые нежно-розовые палочки), постановки уреазного, каталазного и оксидазного биохимических тестов, а также для идентификации с использованием MALDI-TOF масс-спектрометрии (Autof MS1000, Китай).

Чувствительность изолятов *H. pylori* к кларитромицину определяли диско-диффузионным методом (основан на регистрации диаметра зон подавления роста микроорганизма вокруг бумажного диска с антибиотиком). Для постановки теста использовался метод прямого суспендирования культуры *H. pylori* до плотности 0,5 по стандарту мутности МакФарланда, что приблизительно соответствует нагрузке $1\text{--}2 \times 10^8$ КОЕ/мл. Приготовленную бактериальную суспензию в объеме 0,1 мл наносили пипеткой на поверхность чашки Петри с агаром Мюллера-Хинтон с добавлением 5% дефибрированной лошадиной крови и равномерно распределяли по поверхности шпателем. Сразу после инокуляции на поверхность агара асептически наносили диски с кларитромицином (15 мкг/диск) и инкубировали в микроаэрофильных условиях (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) при 37°C в течение 72 ч. После окончания инкубации измеряли диаметр зон полного подавления роста вокруг диска с антибиотиком.

Поскольку пограничные значения для интерпретации результатов диско-диффузионного метода не установлены, в качестве критериев для отнесения штаммов *H. pylori* к категории чувствительных (S) или устойчивых (R) мы использовали размеры зон подавления, представленные в литературных данных: штаммы *H. pylori* считались устойчивыми к кларитромицину при диаметре зоны подавления 0–10 мм (CLR-R ≤ 10 мм), чувствительными – при 22 мм и более (CLR-S ≥ 22 мм; МПК > 0,5 мг/л) [8, 9].

Хромосомную ДНК из чистых культур *H. pylori* выделяли с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN GmbH, Германия) в соответствии с инструкцией производителя. Секвенирование (по Сэнгеру) продукта амплификации размером 1402 п. н. гена 23S рПНК 50 изолятов *H. pylori* проводили с использованием прямого (AGTCGGGTCCTAAGCCGAG) и обратного (TTCCTGCTTAGATGCTTTCAG) праймеров. Обработка хроматограмм, выравнивание сиквенсов на референсную последовательность гена 23S рПНК референсного штамма *H. pylori* 26695 (GenBank acc. no. AE000511.1) и идентификация нуклеотидных замен выполнялись с использованием программы Unipro UGENE v.38.1 [10]. Полученные варианты нуклеотидных последовательностей гена 23S рПНК изолятов *H. pylori* депонированы в международную базу данных GenBank: MN822715.1, MN822718.1, MN822719.1, MN822724.1, MN822794.1, MN822799.1, MN822927.1, MN822928.1.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием языка программирования R v.4.3.2 [11]. Наличие корреляции между двумя группами (фенотипической и генотипической) выявляли с использованием критерия Хи-квадрат и точного критерия Фишера. Двупольные таблицы использовали для расчета отношения шансов (ОШ). Различия между группами считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Результаты определения лекарственной чувствительности 50 изолятов *H. pylori* к кларитромицину (CLR) показали, что 30 изолятов являлись CLR-устойчивыми, 20 – CLR-чувствительными. Для выявления связи между фенотипической и генотипической резистентностью было проведено секвенирование участка гена 23S рПНК 50 изолятов *H. pylori* с целью детекции точечных мутаций, ассоциированных с устойчивостью *H. pylori* к кларитромицину.

Из всех однонуклеотидных замен, выявленных в гене 23S рПНК, только одна из них, A2147G (известная ранее как A2143G), была ассоциирована с фенотипической устойчивостью *H. pylori* к кларитромицину ($p = 0,0002$) (Таблица 1). Так, из 30 CLR-устойчивых изолятов 17 (56,7%) являлись носителями мутации A2147G, тогда как из 20 CLR-чувствительных изолятов лишь один (5,0%) обладал мутацией A2147G.

Другая точечная мутация, A2146G (известная ранее как A2142G), выявлена у 13,3% (4/30) CLR-резистентных изолятов ($p = 0,14$) и отсутствовала у CLR-чувствительных изолятов. Аллельный вариант 2146C в нашем исследовании не обнаружен.

Стоит отметить, что ни один из CLR-устойчивых изолятов не являлся носителем одновременно двух мутаций A2146G/A2147G: все 2147G-изоляты являлись носителями аллеля A2146 и наоборот, все 2146G-изоляты имели аллель A2147. Таким образом, 70,0% (21/30) CLR-устойчивых изолятов являлись носителями одной из двух (A2146G или A2147G) мутаций ($p < 0,001$), в то время как 9 (30,0%) не имели ни одной мутации.

Все клинические изоляты, полученные от ранее леченых больных ($n = 20$), по результатам определения чувствительности были отнесены к группе CLR-устойчивых. Из них 16 (80,0%) являлись носителями мутаций A2146G или A2147G, тогда как в группе впервые выявленных больных ($n = 30$) лишь 5 изолятов (16,7%) являлись носителями одной из двух мутаций ($p = 0,003$) (Рисунок 1).

Помимо точечных замен в позициях 2146/2147, были выявлены однонуклеотидные замены G1567T, C1568A/T, A1825G, G1830A, T1834C, T2186C, однако ни одна из них не была связана с фенотипиче-

Таблица 1. Однонуклеотидные замены в гене 23S рРНК у CLR-устойчивых и CLR-чувствительных клинических изолятов *H. pylori* по сравнению с референсным геномом *H. pylori* 26695

Ген (локус)	Позиция в гене	Нуклеотидная замена	CLR-R (n = 30) N (%)	CLR-S (n = 20) N (%)	p	ОШ
23S рРНК (HP_r01)	2146	A > G	4 (13,3)	0	0,1400	-
	2147	A > G	17 (56,7)	1 (5,0)	0,0002	2.97–1084.82
	1567	G > T	5 (16,7)	5 (25,0)	0,4940	0,12–3,11
	1568	C > A/T	10 (33,3)	8 (40,0)	0,8568	0,12–2,87
	1825	A > G	19 (63,3)	12 (60,0)	1,0000	0,30–4,26
	1830	G > A	17 (56,7)	11 (55,0)	1,0000	0,29–3,86
	1834	T > C	18 (60,0)	11 (55,0)	0,9534	0,33–4,46
	2186	T > C	8 (26,7)	3 (15,0)	0,4895	0,41–13,70

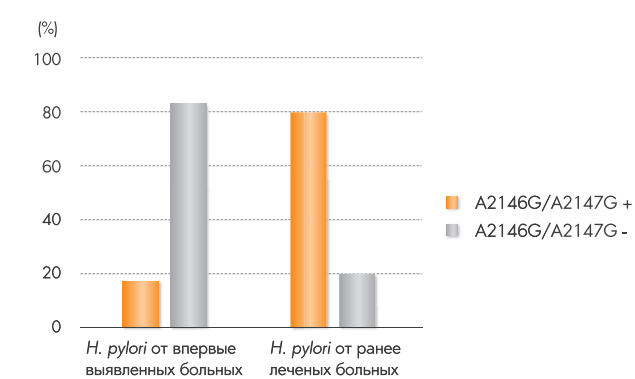


Рисунок 1. Наличие точечных мутаций A2146G/A2147G в гене 23S рРНК у клинических изолятов *H. pylori*, полученных от впервые выявленных и ранее леченых больных

ской лекарственной устойчивостью изолятов *H. pylori* ($p > 0,05$) (Таблица 1).

Обсуждение

Принято считать, что развитие лекарственной устойчивости *H. pylori* к антибактериальным препаратам обусловлено точечными мутациями в хромосомной ДНК и не связано с нуклеотидными заменами в плазмидах [12]. В частности, устойчивость *H. pylori* к кларитромицину ассоциирована с двумя точечными мутациями A2146C/G и A2147G (в соответствии с нумерацией референсного штамма *H. pylori* 26695) в домене V гена 23S рРНК, которые в результате нарушения конформации пептидилтрансферазы ингибируют взаимодействие кларитромицина с рибосомой и приводят к снижению активности макролидов. Однако данные о частоте выявляемости этих мутаций у *H. pylori* в разных странах различаются. Так, в ряде европейских стран 70–90% случаев резистентности к кларитромицину обусловлено наличием мутации A2147G, тогда как мутация A2146G встречается в 9–29% случаев [12–14]. Во Вьетнаме частота встре-

чаемости мутаций A2146G и A2147G составляет 1,8% и 70,5%, тогда как в Корее всего 2% и 25% соответственно [15, 16]. Наиболее интересные данные были получены в Перу, где среди CLR-устойчивых изолятов превалировала мутация A2146G (47%), в то время как 29% изолятов являлись носителями сразу двух мутаций A2146G/A2147G [17].

В российской литературе представлено лишь несколько публикаций, посвященных детекции точечных мутаций в гене 23S рРНК. Так, согласно результатам исследований, проведенных в Казани и Курске, лишь 13% изолятов *H. pylori* являлись носителями мутации A2147G, тогда как мутации A2146G/C выявлено не было [18, 19]. Стоит отметить, что детекция мутаций в упомянутых исследованиях проводилась с использованием ПЦР с последующим рестрикционным анализом.

В результате проведенного нами секвенирования гена 23S рРНК и сравнительного анализа полученных генотипов с данными теста фенотипической лекарственной устойчивости было установлено, что 56,7% CLR-устойчивых изолятов обладали мутацией A2147G ($p < 0,05$). Низкая частота встречаемости аллеля 2146G у изолятов нашей выборки не позволила выявить ассоциацию данной мутации с устойчивостью *H. pylori* к кларитромицину. Однако, учитывая доказанную роль A2146G в развитии лекарственной устойчивости, а также отсутствие изолятов с двумя заменами в позициях 2146/2147, детекция двух точечных мутаций A2146G/A2147G представляется целесообразной ($p < 0,001$) и может служить предиктором фенотипической устойчивости клинических изолятов *H. pylori*.

Особый интерес представляет наличие мутации A2147G у одного штамма *H. pylori*, фенотипически чувствительного к кларитромицину. Подобное «несоответствие» также отмечено некоторыми авторами и может являться как результатом наличия в геноме микроорганизма двух копий гена 23S рРНК, так и результатом присутствия в организме человека смешанной бактериальной популяции, состоящей из чувствительных и резистентных штаммов *H. pylori*. Стоит отметить, что в проведенном ранее исследовании нами было выявлено

наличие комбинированных аллелей *s1s2* и *i1i2* в гене *vasA* у данного изолята, что подтверждает присутствие микст-инфекции в организме человека [20].

Среди фенотипически устойчивых изолятов 30% не обладали ни одной из двух мутаций A2146G/A2147G, что указывает на присутствие иных детерминант резистентности, оказывающих значительное влияние на развитие устойчивости данного патогена к макролидам.

Все клинические изоляты, полученные от ранее леченых больных, являлись CLR-устойчивыми, что согласуется с многочисленными данными о нарастании устойчивости к макролидам в процессе лечения.

Настоящее исследование имеет несколько ограничений. Во-первых, использование диско-диффузионного метода не позволяет определить значения минимальных подавляющих концентраций (МПК), что в свою очередь не позволяет выявить потенциальную корреляцию между возникновением мутации и диапазонами МПК у фенотипически устойчивых изолятов. Во-вторых, ввиду высокой географической гетерогенности популяции *H. pylori* и ограничения нашей выборки территорией Санкт-Петербурга, полученные результаты не отражают паттернов устойчивости в российской популяции *H. pylori*, а отсутствие данных о выявлении и распространении детерминант резистентности на территории России не позволяет провести сравнительный анализ полученных данных.

Несмотря на перечисленные недостатки, полученные нами результаты подтверждают, что точечные мутации A2146G/A2147G в гене 23S рРНК могут быть

использованы в качестве предикторов резистентности клинических изолятов *H. pylori* к кларитромицину, а также стать важной составляющей эпидемиологического надзора за развитием антибиотикорезистентности. Более того, разработка и внедрение новых алгоритмов детекции маркеров резистентности в будущем позволит быстро и своевременно определять профиль антибиотикорезистентности из клинического материала для прогнозирования и назначения адекватной схемы эрадикационной терапии хеликобактерной инфекции.

Заключение

Таким образом, наше исследование показало, что из всех вариантов нуклеотидных замен, выявленных в гене 23S рРНК, только одна из них (A2147G) значимо ассоциирована с фенотипической лекарственной устойчивостью клинических изолятов *H. pylori* к кларитромицину. Несмотря на низкую частоту встречаемости аллеля 2146G, детекция мутаций A2146G + A2147G может служить предиктором фенотипической устойчивости клинических изолятов *H. pylori*. Все клинические изоляты, полученные от ранее леченых больных, являлись CLR-устойчивыми, что подтверждает развитие лекарственной устойчивости к макролидам в процессе лечения. Учитывая, что 30% изолятов нашей выборки не имели ни одной из двух мутаций A2146G/A2147G, поиск новых детерминант резистентности является перспективной задачей для будущих исследований.

Литература

1. Suzuki S., Kusano C., Horii T., Ichijima R., Ikehara H. The ideal *Helicobacter pylori* treatment for the present and the future. *Digestion*. 2022;103(1):62-68. DOI: 10.1159/000519413
2. Malfertheiner P., Megraud F., Rokkas T., Gisbert J.P., Liou J.M., Schulz C., et al. European *Helicobacter* and Microbiota Study group. Management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht VI/Florence consensus report. *Gut*. 2022;gutjnl-2022-327745. DOI: 10.1136/gutjnl-2022-327745
3. Andreev D.N., Maev I.V., Kucheryavyy Y.A. *Helicobacter pylori* resistance in the Russian Federation: a meta-analysis of studies over the past 10 years. *Terapevticheskij arhiv*. 2020;92(11):24-30. Russian. (Андреев Д.Н., Маев И.В., Кучерявый Ю.А. Резистентность *Helicobacter pylori* в Российской Федерации: мета-анализ исследований за последние 10 лет. *Терапевтический архив*. 2020;92(11):24-30.) DOI: 10.26442/00403660.2020.11.000795
4. Bujanda L., Nyssen O.P., Vaira D., Saracino I.M., Fiorini G., Lerang F., et al. The Hp-EuReg investigators. 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. DOI: 10.3390/antibiotics10091058
5. Marques A.T., Vitor J.M.B., Santos A., Oleastro M., Vale F.F. Trends in *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin: from phenotypic to genomic approaches. *Microb Genom*. 2020;6(3):e000344. DOI: 10.1099/mgen.0.000344
6. Serebrova S.Y., Kareva E.N., Kurguzova D.O., Demchenkova E.Yu., Eremenko N.N., Mazerkina I.A., et al. The role of clarithromycin in modern *Helicobacter pylori* eradication therapy regimens. *Meditsinskiy sovet*. 2023;17(8):68-76. Russian. (Сереброва С.Ю., Карева Е.Н., Кургузова Д.О., Демченкова Е.Ю., Еременко Н.Н., Мазеркина И.А. и соавт. Место кларитромицина в современных схемах эрадикационной терапии инфекции *Helicobacter pylori*. *Медицинский совет*. 2023;17(8):68-76.) DOI: 10.21518/ms2023-128
7. Binh T.T., Shiota S., Suzuki R., Matsuda M., Trang T.T., Kwon D.H., Iwatani S., Yamaoka Y. Discovery of novel mutations for clarithromycin resistance in *Helicobacter*

- pylori* by using next-generation sequencing. J Antimicrob Chemother. 2014;69(7):1796-1803. DOI: 10.1093/jac/dku050
8. Akhtereeva A.R., Morozova L.G., Faizullina R.A., Ivanovskaya K.A., Pozdeev O.K., Valeeva I.Kh., et al. Antibiotic susceptibility assessment of *Helicobacter pylori* isolates by disk-diffusion method. BioNanoSci. 2018;8:930-934. DOI: 10.1007/s12668-018-0527-2
 9. Mégraud F., Lehours P. *Helicobacter pylori* detection and antimicrobial susceptibility testing. Clin Microbiol Rev. 2007;20(2):280-322. DOI: 10.1128/CMR.00033-06
 10. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. UGENE team. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. Bioinformatics. 2012;28(8):1166-1167. DOI: 10.1093/bioinformatics/bts091
 11. Revelle W., Revelle M.W. Package 'psych'. The comprehensive R archive network. 2015.
 12. Lauener F.N., Imkamp F., Lehours P., Buissonnière A., Benetjat L., Zbinden R., et al. Genetic determinants and prediction of antibiotic resistance phenotypes in *Helicobacter pylori*. J Clin Med. 2019;8(1):53. DOI: 10.3390/jcm8010053
 13. Bińkowska A., Biernat M.M., Łaczmański Ł., Gościński G. Molecular patterns of resistance among *Helicobacter pylori* strains in South-Western Poland. Front Microbiol. 2018;9:3154. DOI: 10.3389/fmicb.2018.03154
 14. Mégraud F. *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. Gut. 2004;53(9):1374-1384. DOI: 10.1136/gut.2003.022111
 15. Park C.G., Kim S., Lee E.J., Jeon H.S., Han S. Clinical relevance of point mutations in the 23S rRNA gene in *Helicobacter pylori* eradication: a prospective, observational study. Medicine (Baltimore). 2018;97(33):e11835. DOI: 10.1097/MD.00000000000011835
 16. Tran V.H., Nguyen T.M.N., Le P.T.Q., Nguyen T.H.T., Nguyen T.C.L., Ha T.M.T. Current status of *Helicobacter pylori* resistance to clarithromycin and levofloxacin in Vietnam: results from molecular analysis of gastric biopsy specimens. J Glob Antimicrob Resist. 2023;36:76-82. DOI: 10.1016/j.jgar.2023.12.026
 17. Aguilar-Luis M.A., Palacios-Cuervo F., Espinal-Reyes F., Calderón-Rivera A., Levy-Blitchtein S., Palomares-Reyes C., et al. Highly clarithromycin-resistant *Helicobacter pylori* infection in asymptomatic children from a rural community of Cajamarca-Peru. BMC Res Notes. 2018;11(1):809. DOI: 10.1186/s13104-018-3919-z
 18. Abdulkhakov R.A., Abuzarova E.R., Abdulkhakov S.R., Safin A.G., Saifutdinov I.M., Chernov V.M., et al. Resistance of *Helicobacter pylori* to clarithromycin in Kazan. Experimental and clinical gastroenterology. 2012;8:24-29. Russian. (Абдулхаков Р.А., Абузарова Э.Р., Абдулхаков С.Р., Сафин А.Г., Сайфутдинов И.М., Чернов В.М., Чернова О.А. Резистентность *Helicobacter pylori* к кларитромицину в Казани. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2012;8:24-29.)
 19. Kalugin A.A., Stepchenko A.A., Voropaev E.V., Osipkina O.V., Zyatkov A.A. Frequency of detection of polymorphism of *Helicobacter pylori* genes associated with clarithromycin resistance. Kursk scientific and practical bulletin "Man and his health". 2016;3:17-21. Russian. (Калугин А.А., Степченко А.А., Воропаев Е.В., Осипкина О.В., Зятьков А.А. Частота выявления полиморфизма генов *Helicobacter pylori*, ассоциированных с устойчивостью к кларитромицину. Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». 2016;3:17-21.) DOI: 10.21626/vestnik/2016-3/03
 20. Svarval A.V., Starkova D.A., Ferman R.S., Narvskaya O.V. Genetic polymorphisms of *Helicobacter pylori* clinical isolates in St. Petersburg, Russia. Infektsiya i immunitet. 2022;12(2):315-322. Russian. (Сварваль А.В., Старкова Д.А., Ферман Р.С., Нарвская О.В. Геномный полиморфизм клинических изолятов *Helicobacter pylori* в Санкт-Петербурге, Россия. Инфекция и иммунитет. 2022;12(2):315-322.) DOI: 10.15789/2220-7619-GPO-1744