Оригинальное исследование
https://doi.org/10.36233/0372-9311-710

Детерминанты резистентности к левофлоксацину и метронидазолу российских клинических изолятов *Helicobacter pylori* по результатам полногеномного секвенирования

Старкова Д.А.[1]✉, Гладышев Н.С.[2], Полев Д.Е.[1], Саитова А.Т.[1], Глазунова К.А.[3], Егорова С.А.[1], Сварваль А.В.[1]

[1]Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия;
[2]Научно-исследовательский институт морфологии человека имени академика А.П. Авцына Российского научного центра хирургии имени академика Б.В. Петровского, Москва, Россия;
[3]Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, Россия

Аннотация

Введение. Устойчивость к антибактериальным препаратам является одной из ключевых проблем в лечении *Helicobacter pylori*-инфекции, однако в России практически отсутствуют данные о механизмах резистентности к метронидазолу (MTZ) и левофлоксацину (LVX).

Цель работы — выявление детерминант резистентности у клинических изолятов *H. pylori* к MTZ и LVX с использованием данных полногеномного секвенирования.

Материалы и методы. Проведён ретроспективный анализ 43 изолятов *H. pylori*, выделенных от взрослых пациентов (2014–2022 гг.). Чувствительность к антибактериальным препаратам определяли бактериологическим диско-диффузионным методом. Полногеномное секвенирование 43 штаммов *H. pylori* проводили с использованием секвенатора «DNBSEQ-G50».

Результаты. Оценка результатов теста фенотипической лекарственной чувствительности показала, что 11 изолятов являлись чувствительными к MTZ (MTZ-S), 31 — чувствительными к LVX (LVX-S), тогда как 32 изолята проявляли устойчивость к MTZ (MTZ-R), 12 — к LVX (LVX-R). Для выявления ассоциации между фенотипической и генотипической устойчивостью проведён анализ нуклеотидных замен в генах *gyrA*, *gyrB*, *rdxA*, *frxA*, *fdxB*, *fur*. Из всех мутаций, выявленных в генах *gyrA* и *gyrB*, только *D91/GNY* в гене *gyrA* была ассоциирована с фенотипической устойчивостью к LVX и обнаружена у 4/12 (33,3%) изолятов ($p < 0,05$). Комбинированная мутация *D91G/N/Y+N87K* в гене *gyrA* выявлена у 6/12 (50,0%) LVX-R-изолятов ($p < 0,001$). У 21,9% (7/32) MTZ-R-изолятов в гене *rdxA* выявлены точечные мутации, приводящие к сдвигу рамки считывания или преждевременной терминации синтеза белка. Ни одна из мутаций в генах *frxA*, *fur* и *fdxB* не была ассоциирована с устойчивостью *H. pylori* к MTZ.

Выводы. По результатам полногеномного секвенирования российских клинических изолятов *H. pylori* детекция комбинированной мутации *D91G/N/Y+N87K* в гене *gyrA* может служить предиктором фенотипической устойчивости *H. pylori* к LVX.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori, полногеномное секвенирование, устойчивость к антибактериальным препаратам, детерминанты резистентности, метронидазол, левофлоксацин*

Этическое утверждение. Исследование проведено с соблюдением строгих норм конфиденциальности: все данные пациентов деперсонифицированы и зашифрованы. От каждого участника исследования получено информированное согласие. Протокол исследования одобрен независимым локальным этическим комитетом НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера (протокол № 50/04–2019 от 22.06.2020).

Источник финансирования. Авторы заявляют об отсутствии внешнего финансирования при проведении исследования.

Конфликт интересов. Авторы декларируют отсутствие явных и потенциальных конфликтов интересов, связанных с публикацией настоящей статьи.

Для цитирования: Старкова Д.А., Гладышев Н.С., Полев Д.Е., Саитова А.Т., Глазунова К.А., Егорова С.А., Сварваль А.В. Детерминанты резистентности к левофлоксацину и метронидазолу российских клинических изолятов *Helicobacter pylori* по результатам полногеномного секвенирования. *Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии.* 2025;102(4):465–473.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-710
EDN: https://www.elibrary.ru/YYLGLL

© Старкова Д.А., Гладышев Н.С., Полев Д.Е., Саитова А.Т., Глазунова К.А., Егорова С.А., Сварваль А.В., 2025

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-710
ORIGINAL RESEARCHES

Original Study Article
https://doi.org/10.36233/0372-9311-701

Determinants of resistance to levofloxacin and metronidazole in Russian *Helicobacter pylori* clinical isolates based on whole-genome sequencing data

Daria A. Starkova[1]✉, Nikita S. Gladyshev[2], Dmitrii E. Polev[1], Alina T. Saitova[1], Ksenia A. Glazunova[3], Svetlana A. Egorova[1], Alena V. Svarval[1]

[1]St. Petersburg Pasteur institute, St. Petersburg, Russia;
[2]Avtsyn Research Institute of Human Morphology of Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russia;
[3]Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia

Abstract

Introduction. Helicobacter pylori infection, however, data on the mechanisms of metronidazole (MTZ) and levofloxacin (LVX) resistance in Russia remain scarce. and levofloxacin (LVX) in Russia.

The aim of the study is to identify the determinants of resistance in clinical isolates of *H. pylori* to MTZ and LVX using whole-genome sequencing data.

Materials and methods. A retrospective analysis of 43 *H. pylori* isolates obtained from adult patients (2014–2022) was conducted. Susceptibility to antibiotics was determined using the bacteriological disk diffusion method. Whole-genome sequencing of 43 *H. pylori* strains was performed using a DNBSEQ-G50 sequencer.

Results. The evaluation of the phenotypic drug susceptibility test results showed that 11 isolates were susceptible to MTZ (MTZ-S), 31 were susceptible to LVX (LVX-S), while 32 isolates were resistant to MTZ (MTZ-R), and 12 were resistant to LVX (LVX-R). To identify the association between phenotypic and genotypic resistance, an analysis of nucleotide substitutions in the *gyrA, gyrB, rdxA, frxA, fdxB* and *fur* genes was conducted. Of all the mutations identified in the *gyrA* and *gyrB* genes, only *D91/GNY* in the *gyrA* gene was associated with phenotypic resistance to LVX and was found in 4/12 (33.3%) of the isolates ($p < 0.05$). The combined mutation *D91G/N/Y+N87K* in the *gyrA* gene was detected in 6/12 (50.0%) of LVX-R isolates ($p < 0.001$). Point mutations in the *rdxA* gene were detected in 21.9% (7/32) of MTZ-R isolates, leading to a frameshift or premature termination of protein synthesis. None of the mutations in the *frxA*, *fur* and *fdxB* genes were associated with *H. pylori* resistance to MTZ.

Conclusion. Based on the results of whole-genome sequencing of Russian clinical isolates of *H. pylori*, the detection of the combined mutation *D91G/N/Y+N87K* in the *gyrA* gene can serve as a predictor of the phenotypic resistance of *H. pylori* to levofloxacin.

Keywords: *Helicobacter pylori, whole-genome sequencing, antibiotic resistance, resistance determinants, metronidazole, levofloxacin*

Ethics approval. The study was conducted in strict compliance with confidentiality standards: all patient data was made anonymous and encrypted. Informed consent was obtained from each study participant. The study protocol was approved by the Independent Local Ethics Committee of the Pasteur Research Institute of Epidemiology and Microbiology (protocol No. 50/04–2019 dated June 22, 2020).

Funding source. This study was not supported by any external sources of funding.

Conflict of interest. The authors declare no apparent or potential conflicts of interest related to the publication of this article.

For citation: Starkova D.A., Gladyshev N.S., Polev D.E., Saitova A.T., Glazunova K.A., Egorova S.A., Svarval A.V. Determinants of resistance to levofloxacin and metronidazole in Russian *Helicobacter pylori* clinical isolates based on whole-genome sequencing data. *Journal of microbiology, epidemiology and immunobiology.* 2025;102(4):465–473.
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-710
EDN: https://www.elibrary.ru/YYLGLL

Введение

Инфекция *Helicobacter pylori* остаётся одной из самых распространённых хронических бактериальных инфекций в мире и считается основным фактором риска развития рака желудка (около 90% случаев) [1]. Согласно ключевым положениям Маастрихт VI/Флорентийского консенсуса, лежащего в основе национальных клинических рекомендаций, инфекция *H. pylori* (независимо от симптомов или осложнений) всегда вызывает гастрит, единственным методом лечения которого является эрадикационная терапия. Кроме того, согласно первому положению, для рационального использования антибиотиков целесообразно проводить тесты на

© Starkova D.A., Gladyshev N.S., Polev D.E., Saitova A.T., Glazunova K.A., Egorova S.A., Svarval A.V., 2025

лекарственную чувствительность до назначения терапии 1-й линии [2, 3].

Устойчивость *H. pylori* к антибактериальным препаратам (АБП) признана на сегодняшний день одной из самых серьёзных проблем. Для эрадикации *H. pylori* используется комбинированная терапия, состоящая из 2–3 АБП: амоксициллин, кларитромицин, метронидазол (MTZ), тетрациклин, левофлоксацин (LVX), рифабутин; ингибитора протонной помпы и препаратов висмута (или без него) [2, 3]. Однако в последние годы наблюдается неуклонное снижение уровня эффективности антихеликобактерной терапии параллельно с развивающейся устойчивостью к противомикробным препаратам [4, 5]. Более того, широкое применение АБП или низкий уровень комплаенса при лечении приводят к развитию устойчивости не только *H. pylori*, но и других бактерий микробиома желудочно-кишечного тракта, способствуя селективному давлению АБП в сторону отбора генов резистентности, обогащению резистома и распространению среди бактериальных сообществ [6, 7].

Молекулярно-генетические механизмы, лежащие в основе развития антибиотикорезистентности (АБР) *H. pylori*, полностью не изучены. Принято считать, что устойчивость *H. pylori* к АБП обусловлена мутациями в хромосомной ДНК *de novo*, которые либо изменяют мишень действия АБП, либо препятствуют его активации внутри клеток [6]. Тем не менее у значительной доли штаммов *H. pylori*, устойчивых к АБП, отсутствуют известные генетические детерминанты резистентности. Это указывает на сложный и многофакторный характер механизмов устойчивости, выходящий за рамки мутационной активности и/или активации отдельных генов в ответ на применение АБП. К потенциальным механизмам устойчивости *H. pylori* относят:

- повышенную экспрессию генов системы эффлюкса;
- синергетические взаимодействия, включающие мутации, горизонтальный перенос генов и активацию защитных систем;
- клеточную адаптацию, связанную с образованием биопленок и коккоидов, устойчивых к АБП;
- компенсаторные мутации, нейтрализующие снижение фитнеса устойчивых штаммов за счёт эпистатического взаимодействия с детерминантами резистентности;
- гетерорезистентность — феномен, при котором в бактериальной популяции одновременно присутствуют субпопуляции клеток с разной чувствительностью к АБП.

Все перечисленные механизмы не только способствуют формированию АБР *H. pylori*, но и ускоряют развитие полирезистентности, что существенно усложняет процесс эрадикации и подчёркивает необходимость постоянного пересмотра и усовершенствования терапевтических подходов [6–8].

Механизм действия MTZ — препарата 1-й линии эрадикационной терапии *H. pylori* — заключается в восстановлении нитрогруппы в анаэробных условиях, что приводит к образованию цитотоксичных нитроанионов и свободных радикалов, повреждающих ДНК и нарушающих функционирование бактериальных клеток. Устойчивость *H. pylori* к MTZ обусловлена совокупностью сложных генетических и биохимических процессов, которые до настоящего времени полностью не изучены. Основной механизм резистентности к MTZ опосредован инактивацией генов ферментов редуктаз rdxA (кодирует нечувствительную к кислороду нитроредуктазу) и frxA (кодирует флавиноксидазу), что снижает способность MTZ восстанавливаться до активных форм (NO_2^- и NO_2^{2-}) и, как следствие, уменьшает антимикробное действие препарата [9, 10]. Мутации в гене *fur*, регулирующем захват железа, и *fdxB*, кодирующем ферредоксин, предположительно также могут способствовать формированию АБР [7, 8, 10]. Повышение уровня антиоксидантных ферментов и системы эффлюкса, а также мутационной активности в генах, ответственных за репарацию повреждённой ДНК, выступают в роли дополнительных факторов, способствующих развитию резистентности *H. pylori* к MTZ [6].

Другой препарат, выступающий в качестве резервной терапии для лечения хеликобактериоза, — LVX — оказывает антибактериальный эффект за счёт ингибирования топоизомеразы II (ДНК-гиразы) и топоизомеразы IV — ключевых ферментов, участвующих в процессах репликации и рекомбинации ДНК. Наиболее распространённый механизм резистентности *H. pylori* к фторхинолонам обусловлен точечными мутациями в области QRDR (Quinolone Resistance-Determining Regions), определяющей резистентность к хинолонам: мутации в кодонах 86, 87, 88, 91, 97 гена *gyrA* и кодонах 481, 484 и 463 гена *gyrB* [6, 7, 10]. Однако роль некоторых из перечисленных мутаций в развитии устойчивости *H. pylori* к LVX не доказана.

В России практически отсутствуют систематизированные и достоверные данные о распространённости устойчивости *H. pylori* к LVX и MTZ. Кроме того, исследований, посвящённых выявлению генетических детерминант резистентности к данным АБП, практически нет, что затрудняет разработку эффективных молекулярно-генетических методов диагностики и мониторинга резистентности в клинической практике.

Целью нашего исследования явилось выявление детерминант резистентности у клинических изолятов *H. pylori* к MTZ и LVX с использованием данных полногеномного секвенирования.

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-710
ORIGINAL RESEARCHES

Материалы и методы

Проведён ретроспективный анализ 43 клинических изолятов *H. pylori*, выделенных от взрослых пациентов с заболеваниями желудочно-кишечного тракта (2014–2022 гг.) в Санкт-Петербургском научно-исследовательском институте эпидемиологии и микробиологии им. Пастера. Средний возраст пациентов составлял 44,0 ± 4,5 года (22–70 лет).

Биоптаты слизистой оболочки антрального отдела и/или дна желудка, помещённые в тиогликолевую среду, подлежали гомогенизации и последующему культивированию на селективной среде на основе Колумбийского агара с добавлением 7% дефибринированной лошадиной крови и 1% раствора IsoVitalex при 37°C в микроаэрофильных условиях (содержание кислорода ~ 5%) с использованием газогенерирующих пакетов GasPak 100 (BBL CampyPak Plus Microaerophilic System envelopes with Palladium Catalyst, «BD Biosciences»). Для идентификации *H. pylori* использовали набор биохимических тестов (уреазный, каталазный и оксидазный) и набор реагентов для выявления ДНК *H. pylori* методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) («ДНК-Технология»).

Для постановки теста лекарственной чувствительности бактериальную культуру *H. pylori* суспендировали до плотности 2 по стандарту мутности Мак-Фарланда (~ 6×10^8 КОЕ/мл), наносили 0,1 мл на поверхность чашки Петри с агаром Мюллера–Хинтона с добавлением 5% дефибринированной лошадиной крови и равномерно распределяли по поверхности шпателем. Чувствительность изолятов *H. pylori* к MTZ и LVX определяли диско-диффузионным методом: сразу после инокуляции на поверхность агара асептически наносили диски с MTZ (5 мкг/диск) и LVX (5 мкг/диск) инкубировали в микроаэрофильных условиях (5% O_2, 10% CO_2, 85% N_2) при 37°C в течение 72 ч. После окончания инкубации измеряли диаметр зон полного подавления роста вокруг диска с антибиотиком (мм). Интерпретацию результатов диско-диффузионного метода проводили на основании пороговых значений, представленных в публикации Z. Zhong и соавт.: штаммы *H. pylori* считались устойчивыми к MTZ (MTZ-R) при диаметре зоны ингибиции ≤ 16 мм, чувствительными (MTZ-S) при диаметре ≥ 17 мм; устойчивыми к LVX (LVX-R) — при диаметре зоны ингибиции ≤ 17 мм, чувствительными (LVX-S) — при диаметре ≥ 18 мм [11].

Хромосомную ДНК из чистых культур *H. pylori* выделяли с помощью набора «QIAamp DNA Mini Kit» («QIAGEN GmbH») в соответствии с инструкцией производителя. Концентрация ДНК каждого образца была количественно определена на флуориметре «Qubit 4.0». Полногеномное секвенирование проводили на секвенаторе «DNBSEQ-G50» («MGI Tech Co. Ltd.»).

Оценку качества парно-концевых библиотек, удаление адаптеров и последовательностей низкого качества (Q-score < 20) проводили с помощью программ «FastQC v. 0.12.1» и «Trim Galore! v. 0.6.7». Бактериальные геномы были собраны *de novo* с помощью геномного ассемблера «SPAdes v. 3.13.1», а результаты были оценены с помощью «QUAST v. 5.2.0» [12, 13]. Полученные геномные последовательности были выровнены на последовательность референсного штамма *H. pylori* 26695 (GenBank acc. no. AE000511.1). Для оценки генетических вариаций между изолятами и выявления нуклеотидных замен использовали программу «Snippy v. 4.6.0»[1]. Выровненные нуклеотидные последовательности были визуально проанализированы с помощью «UGENE v. 38.1» [14]. Все сборки геномов клинических изолятов *H. pylori* были депонированы в базу данных NCBI GenBank под регистрационным номером PRJNA1011037[2].

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием языка программирования R v. 4.3.2. Наличие корреляции между двумя группами (фенотипической и генотипической) выявляли с использованием критерия χ^2 и точного критерия Фишера. Различия между группами считали значимыми при $p < 0,05$.

Результаты

Анализ теста фенотипической лекарственной чувствительности показал, что среди 43 клинических изолятов *H. pylori* 12 проявляли устойчивость к LVX (LVX-R), 32 — к MTZ (MTZ-R); в то же время 31 изолят был чувствителен к LVX (LVX-S), 11 — к MTZ (MTZ-S). Среди резистентных изолятов 9 проявляли устойчивость одновременно к обоим препаратам (группа ***A***), тогда как среди чувствительных изолятов 8 были чувствительны как к LVX, так и к MTZ (группа ***B***: **рисунок**).

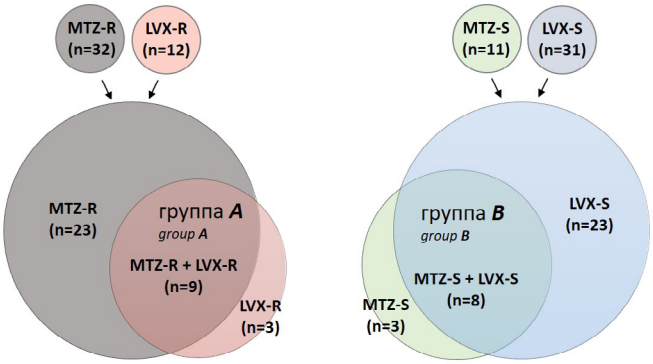

Диаграмма Венна, отображающая комбинации статусов фенотипической лекарственной чувствительности клинических изолятов *H. pylori* к MTZ и LVX.

[1] URL: https://github.com/tseemann/snippy
[2] URL: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/bioproject/PRJNA1011037

Для поиска детерминант резистентности к LVX и MTZ и их ассоциации с фенотипической устойчивостью все 43 изолята были подвергнуты полногеномному секвенированию, после чего проведён анализ нуклеотидных замен в генах *gyrA*, *gyrB*, *rdxA*, *frxA*, *fdxB* и *fur*.

Из всех мутаций в гене *gyrA* только *D91N/Y/G* была ассоциирована с фенотипической лекарственной устойчивостью и выявлена у 33,3% (4/12) LVX-R-изолятов ($p < 0,05$) (**таблица**). Миссенс-мутация *N87K* в гене *gyrA* выявлена у 16,7% (2/12) LVX-R-изолятов и не встречалась в сочетании с мутациями *D91N/Y/G* и *A88P*, тогда как мутация *A88P* выявлена лишь у 1 (8,3%) устойчивого штамма в сочетании с мутацией *D91N*. С учётом отсутствия указанных мутаций у LVX-S-изолятов, комбинированная мутация *D91N/Y/G+N87K* значимо ассоциирована с устойчивостью клинических изолятов и выявлена у 50,0% (6/12) LVX-R-изолятов ($p < 0,001$). Следует отметить, что мутации *D91N/Y/G*, *N87K* и *A88P* в гене *gyrA* были обнаружены исключительно у изолятов, входящих в группу *A*, и отсут-

Мутации в генах устойчивости к LVX и MTZ у клинических изолятов *H. pylori* по сравнению с геномом референсного штамма *H. pylori* 26695, *n* (%)

Ген (локус)	Аминокислотная замена	LVX-R (*n* = 12)	LVX-S (*n* = 31)	MTZ-R (*n* = 32)	MTZ-S (*n* = 11)	*p*
gyrA (HP_0701)	*D91N/Y/G*	4 (33,3)	0			0,0040
	N87K	2 (16,7)	0			0,0730
	A88P	1 (8,3)	0			0,2790
gyrB (HP_0501)	*D481E*	3 (25,0)	8 (25,8)			~ 1,0000
	R484K	3 (25,0)	8 (25,8)			~ 1,0000
rdxA (HP_0954)	*S108A/P*			7 (21,9)	0	0,1628
	R16C			7 (21,9)	0	0,1628
	L62V			6 (18,7)	0	0,3122
	Ter211R_ext stop lost & splice region*			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	*Q50*stop*			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	*W52*stop*			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	H97fs			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	S43fs			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	I182fs			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	M120fs			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	R131K			12 (37,5)	1 (9,1)	0,1290
	T31E			13 (40,6)	5 (45,4)	0,7794
	D59N			30 (93,7)	9 (81,8)	0,2665
frxA (HP_0642)	*K18fs*			17 (53,1)	5 (45,4)	0,6606
	Y19fs			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	*Q27*stop*			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	R23fs			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	I44fs			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	A70fs			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	R106fs			1 (3,1)	1 (9,1)	0,4507
	*W137*stop*			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	*Q141*stop*			1 (3,1)	0	~ 1,0000
	V215fs			10 (31,2)	6 (54,5)	0,1679
fdxB (HP_1508)	*N424fs*			1 (3,1)	1 (9,1)	0,4507
	K426fs			1 (3,1)	1 (9,1)	0,4507
fur (HP_1027)	*C150Y*			3 (9,4)	2 (18,2)	0,5890
	N118Q			7 (21,9)	3 (27,3)	0,6982

JOURNAL OF MICROBIOLOGY, EPIDEMIOLOGY AND IMMUNOBIOLOGY. 2025; 102(4)
DOI: https://doi.org/10.36233/0372-9311-710

ствовали у монорезистентных изолятов. Все мутации в гене *gyrB* присутствовали у изолятов *H. pylori* независимо от их фенотипической устойчивости ($p > 0,05$). Мутации в позициях 86, 97 гена *gyrA* и 463 гена *gyrB*, предположительно ассоциированные с резистентностью *H. pylori* к LVX, в нашей выборке не обнаружены.

Всего в гене *rdxA* выявлено 56 точечных мутаций, из которых 4 (*H97fs*, *S43fs*, *I182fs*, *M120fs*) относились к мутациям, приводящим к сдвигу рамки считывания (frameshift, fs), 2 (*Q50*stop*, *W52*stop*) — к преждевременной терминации рамки считывания, *Ter211R_ext** — к потере стоп-кодона и слиянию *rdxA* с соседним геном *HP_0953*. Две мутации (*S108A/P*, *L62V*) выявлены нами впервые у MTZ-R-изолятов и отсутствовали у MTZ-S-изолятов, однако без ассоциации с фенотипической устойчивостью ($p > 0,05$). Мутации *R131K*, *T31E* и *D59N* обнаружены у изолятов *H. pylori* в 2 фенотипических группах и не связаны с фенотипической устойчивостью к MTZ.

В гене *frxA* нами выявлены 7 мутаций, приводящих к сдвигу рамки считывания, из которых 4 (*Y19fs*, *R23fs*, *I44fs*, *A70fs*) присутствовали в геноме только MTZ-R-изолятов, 3 (*K18fs*, *R106fs*, *V215fs*) выявлены у изолятов обеих фенотипических групп. В то же время 3 нонсенс-мутации, приводящие к преждевременной терминации белка, обнаружены исключительно в геномах MTZ-R-штаммов (таблица). В гене *fdxB* 2 мутации (*N424fs*, *K426fs*) присутствовали в геноме как MTZ-R-, так и MTZ-S-изолятов. Ни одна из миссенс-мутаций в генах *frxA* и *fdxB* не была ассоциирована с фенотипической устойчивостью к MTZ.

Всего в гене *fur* выявлено 12 миссенс-мутаций, из которых *C150Y* и *N118Q* являлись доминирующими, однако ни одна из них не была связана с фенотипической устойчивостью *H. pylori* к MTZ. Мутаций, приводящих к сдвигу рамки считывания или замене аминокислоты на стоп-кодон, в гене *fur* у изолятов нашей выборки не обнаружено.

Обсуждение

Неуклонный рост АБР *H. pylori* во всём мире существенно влияет на эффективность схем эрадикационной терапии. По результатам метаанализа в России за 2011–2020 гг., наиболее значительный рост устойчивости *H. pylori* отмечен к MTZ (33,95%) и LVX (20,0%) [15]. Однако анализ исследований за 2015–2019 и 2020–2024 гг. выявил снижение LVX-R с 18,3 до 17,1% [15, 16]. Вместе с тем необходимо признать, что данные по уровням и распространённости АБР отсутствуют для большинства регионов России [2].

Наше исследование, включающее 43 клинических изолята *H. pylori,* выделенных за 2014–2022 гг. на территории Санкт-Петербурга, показало высокий уровень MTZ-R — 74,4%, что указывает на необходимость проведения полномасштабного исследования резистентности *H. pylori* в данном регионе и ставит под сомнение эффективность применения MTZ в схеме эрадикационной терапии. Напротив, к LVX — препарату 2-й и 3-й линий — штаммы нашей выборки показали более низкую устойчивость — 27,9%. Однако стоит отметить, что среди LVX-R-изолятов лишь 15,0% являлись монорезистентными.

Суммируя представленные нами ранее данные по устойчивости данной выборки к кларитромицину, 20,9% изолятов *H. pylori* являются полирезистентными и проявляют устойчивость одновременно к 3 АБП: LVX, MTZ и кларитромицину [17]. Полирезистентные штаммы *H. pylori* являются глобальной проблемой современной гастроэнтерологии и основным препятствием для эффективного проведения эрадикационной терапии. При наличии резистентности *H. pylori* к одному из основных АБП частота неудач стандартных схем эрадикации может достигать 30%, а при двойной резистентности — превышать 70% [18, 19]. Поскольку выбор схемы эрадикации носит эмпирический характер, полученные данные диктуют необходимость глобального регионального и локального мониторинга АБР *H. pylori* в нашей стране, а также адаптации соответствующих стратегий лечения в каждом регионе в зависимости от полученных данных и внедрения программы рационального использования АБП в схемах эрадикационной терапии [20].

В связи с тем, что полногеномное секвенирование является наиболее точным, надёжным, быстрым и эффективным методом определения известных и поиска новых паттернов резистентности, мы использовали данный метод для выявления детерминант резистентности к LVX и MTZ, а также их ассоциации с фенотипической лекарственной устойчивостью российской популяции *H. pylori*.

Анализ полученных данных показал, что из всех мутаций в генах *gyrA* и *gyrB* только *D91Y/N/G* в гене *gyrA* значимо ассоциирована с фенотипической устойчивостью *H. pylori* к LVX ($p < 0,05$). Другая мутация, связанная с развитием резистентности к фторхинолонам, — *N87K* — в нашем исследовании выявлена лишь в 16,7% случаев ($p > 0,05$). Тем не менее, учитывая низкую частоту обнаружения мутации *D91Y/N/G*, а также отсутствие мутаций *D91* и *N87* у LVX-S-изолятов, целесообразно рассматривать комбинированную детекцию мутаций *D91Y/N/G* и *N87K* в качестве более надёжных предикторов устойчивости *H. pylori* к LVX. С другой стороны, принимая во внимание высокую долю LVX-R-штаммов, не несущих маркеров резистентности в своём геноме (50,0%), генотипирование гена *gyrA* для детекции фенотипической устойчивости к LVX может быть недостаточным, что, в свою

очередь, ставит под сомнение рациональность использования генотипа *D91+N87 gyrA* в качестве единственных мишеней при разработке ПЦР-тестов для определения АБР *H. pylori* в клинической практике. Следует отметить, что мутации *D91* и *N87* присутствовали геноме только полирезистентных изолятов, тогда как среди монорезистентных к LVZ изолятов данные мутации не выявлены. Это может свидетельствовать как о существовании других, не изученных механизмов резистентности, так и об участии фенотипических механизмов резистентности, таких как изменение уровня экспрессии систем эффлюкса, формирования биоплёнок и др. Кроме того, полирезистентные штаммы могут возникать под давлением комбинированной антибиотикотерапии, что стимулирует накопление мутаций, в том числе в гене *gyrA,* связанного с устойчивостью к фторхинолонам. Полученные данные нуждаются в дальнейшем изучении с использованием расширенной выборки устойчивых и чувствительных к LVX изолятов *H. pylori.*

Ввиду высокой гетерогенности штаммов *H. pylori* изучение и выявление механизмов устойчивости *H. pylori* к MTZ остаётся сложной задачей. Принято считать, что устойчивость *H. pylori* к MTZ обусловлена главным образом инактивацией генов *rdxA* и *frxA*, кодирующих восстановленную форму никотинамидадениндинуклеотидфосфат (NAD(P)H) нитроредуктазы и флавиннитроредуктазы, катализирующих снижение количества MTZ в клетке [21]. В многочисленных зарубежных исследованиях показано, что большинство MTZ-R-штаммов *H. pylori* являются носителями множественных нонсенс- и/или fs-мутаций, приводящих к потере функциональных сайтов связывания нитроредуктаз.

В нашем исследовании мутации в гене *rdxA*, приводящие к потере стоп-кодона, преждевременной терминации или сдвигу рамки считывания, были обнаружены у 21,9% MTZ-R-изолятов и отсутствовали в группе MTZ-S-изолятов. Это может указывать на роль данного гена в развитии АБР у российской популяции *H. pylori*. Согласно данным E.G. Chua и соавт., мутация *R16H/C* в гене *rdxA* ассоциирована с фенотипической устойчивостью изолятов *H. pylori* к MTZ [22]. Результаты настоящего исследования показали, что мутация *R16C*, а также мутации *S108A/P* и *L62V* в гене *rdxA* встречались только у изолятов, устойчивых к MTZ, с частотой 21,9, 21,9 и 18,7% соответственно. Однако, учитывая неравномерное распределение долей MTZ-R и MTZ-S изолятов в нашей выборке (74,4 и 25,6%), влияние данных мутаций на развитие фенотипической устойчивости к MTZ ещё предстоит выяснить.

Аналогично, множественные мутации, приводящие к потере функциональности генов *frxA* и *fdxB*, могут являться предикторами фенотипической устойчивости *H. pylori* к MTZ. В нашем исследовании fs-мутации в указанных генах, приводящие к сдвигу рамки считывания, распределялись между изолятами как устойчивой, так и чувствительной фенотипических групп. В гене *fur* мутаций, ассоциированных с фенотипической устойчивостью к MTZ, не выявлено. Полученные результаты косвенно свидетельствуют о том, что указанные гены, по всей видимости, не играют ключевой роли в развитии устойчивости *H. pylori* к MTZ в исследуемой популяции. Тем не менее для более точного понимания механизмов резистентности необходимо дополнительное исследование, включающее комплексный анализ других потенциальных генетических факторов в совокупности с возможными синергетическими или эпистатическими взаимодействиями.

Ограничения исследования. Размер выборки ограничен как численно, так и территориально, что не позволяет выявить закономерности генотипической и фенотипической устойчивости изолятов *H. pylori* на всей территории России. Наблюдалось неравномерное распределение устойчивых и чувствительных к MTZ и LVX изолятов, что существенно осложняет интерпретацию полученных данных и снижает статистическую надёжность результатов. Однако, несмотря на указанные ограничения, наши данные предоставили важную информацию о паттернах резистентности российских клинических изолятов *H. pylori*, а также подчеркнули необходимость глобального мониторинга АБР в нашей стране.

Заключение

На основании данных полногеномного секвенирования, выполненного нами впервые, было проведено комплексное исследование фенотипической и генотипической резистентности российских клинических изолятов *H. pylori* к LVX и MTZ. Результаты исследования продемонстрировали высокую долю изолятов, устойчивых к MTZ и LVX, а также высокую частоту полирезистентных изолятов, устойчивых одновременно к 3 АБП (LVX + MTZ + кларитромицин). Несмотря на ограниченный размер выборки, нам удалось подтвердить ключевую роль мутаций *D91* и *N87* в гене *gyrA* в формировании устойчивости *H. pylori* к LVX. Однако высокая частота устойчивых изолятов, не несущих известных детерминант резистентности, ставит под сомнение эффективность существующих и разрабатываемых тест-систем для определения чувствительности *H. pylori*, а также диктует необходимость проведения более масштабных исследований механизмов АБР изолятов *H. pylori*.

Полученные результаты подчёркивают исключительную важность вопросов, связанных с непрерывным мониторингом АБР *H. pylori* в нашей стране, а также контролем динамики изменения ге-

нома и механизмов формирования АБР. Это, в свою очередь, может стать предпосылкой к оптимизации схем эрадикационной терапии и повышению эффективности лечения инфекций, обусловленных *H. pylori*, в разных регионах России.

СПИСОК ИСТОЧНИКОВ | REFERENCES

1. Moss S.F., Shah S.C., Tan M.C., El-Serag H.B. Evolving concepts in *Helicobacter pylori* management. *Gastroenterology*. 2024;166(2):267–83.
DOI: https://doi.org/10.1053/j.gastro.2023.09.047.
2. Ивашкин В.Т., Маев И.В., Лапина Т.Л. и др. Клинические рекомендации Российской гастроэнтерологической ассоциации по диагностике и лечению инфекции *Helicobacter pylori* у взрослых. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2018;28(1):55–70. Ivashkin V.T., Maev I.V., Lapina T.L., et al. Diagnostics and treatment of *Helicobacter pylori* infection in adults: Clinical guidelines of the Russian gastroenterological association. *Russian Journal of Gastroenterology, Hepatology, Coloproctology*. 2018;28(1):55–70.
DOI: https://doi.org/10.22416/1382-4376-2018-28-1-55-70
EDN: https://elibrary.ru/oulikb
3. Malfertheiner P., Megraud F., Rokkas T., et al. European Helicobacter and Microbiota Study group. Management of *Helicobacter pylori* infection: the Maastricht VI/Florence consensus report. *Gut*. 2022;71(9):327745.
DOI: https://doi.org/10.1136/gutjnl-2022-327745
4. 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):1372–82.e17.
DOI: https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.07.007
5. Zhao M., Zhang Y., Liu S., et al. Eradication of *Helicobacter pylori* reshapes gut microbiota and facilitates the evolution of antimicrobial resistance through gene transfer and genomic mutations in the gut. *BMC Microbiol*. 2025;25(1):90.
DOI: https://doi.org/10.1186/s12866-025-03823-w
6. Hasanuzzaman M., Bang C.S., Gong E.J. Antibiotic resistance of *Helicobacter pylori*: mechanisms and clinical implications. *J. Korean Med. Sci*. 2024;39(4):e44.
DOI: https://doi.org/10.3346/jkms.2024.39.e44
7. Schuetz A.N., Theel E.S., Cole N.C., et al. Testing for *Helicobacter pylori* in an era of antimicrobial resistance. *J. Clin. Microbiol*. 2024;62(2):e0073223.
DOI: https://doi.org/10.1128/jcm.00732-23
8. Dascălu R.I., Bolocan A., Păduaru D.N., et al. Multidrug resistance in *Helicobacter pylori* infection. *Front. Microbiol*. 2023;14:1128497.
DOI: https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1128497
9. Medakina I., Tsapkova L., Polyakova V., et al. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance: molecular basis and diagnostic methods. *Int. J. Mol. Sci*. 2023;24(11):9433.
DOI: https://doi.org/10.3390/ijms24119433
10. Saracino I.M., Pavoni M., Zullo A., et al. Next generation sequencing for the prediction of the antibiotic resistance in *Helicobacter pylori:* a literature review. *Antibiotics* (*Basel*). 2021;10(4):437.
DOI: https://doi.org/10.3390/antibiotics10040437
11. Zhong Z., Zhang Z., Wang J., et al. A retrospective study of the antibiotic-resistant phenotypes and genotypes of *Helicobacter pylori* strains in China. *Am. J. Cancer Res*. 2021;11(10):5027–37.
12. Gurevich A., Saveliev V., Vyahhi N., Tesler G. QUAST: quality assessment tool for genome assemblies. *Bioinformatics*. 2013;29(8):1072–5.
DOI: https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt086
13. Prjibelski A., Antipov D., Meleshko D., et al. Using SPAdes *de novo* assembler. *Curr. Protoc. Bioinformatics*. 2020;70(1):e102.
DOI: https://doi.org/10.1002/cpbi.102
14. Okonechnikov K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit. *Bioinformatics*. 2012;28(8):1166–7.
DOI: https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts091
15. Андреев Д.Н., Маев И.В., Кучерявый Ю.А. Резистентность *Helicobacter pylori* в Российской Федерации: метаанализ исследований за последние 10 лет. *Терапевтический архив*. 2020;92(11):24–30. Andreev D.N., Maev I.V., Kucheryavyy Yu.A. *Helicobacter pylori* resistance in the Russian Federation: a meta-analysis of studies over the past 10 years. *Therapeutic Archive*. 2020;92(11):24–30.
DOI: https://doi.org/10.26442/00403660.2020.11.000795
EDN: https://elibrary.ru/gsmibf
16. Andreev D.N., Khurmatullina A.R., Maev I.V., et al. *Helicobacter pylori* antibiotic resistance in Russia: a systematic review and meta-analysis. *Antibiotics (Basel)*. 2025;14(5):524.
DOI: https://doi.org/10.3390/antibiotics14050524
17. Starkova D., Gladyshev N., Polev D., et al. First insight into the whole genome sequence variations in clarithromycin resistant *Helicobacter pylori* clinical isolates in Russia. *Sci. Rep*. 2024;14(1):20108.
DOI: https://doi.org/10.1038/s41598-024-70977-4
18. Zou Y., Qian X., Liu X., et al. The effect of antibiotic resistance on *Helicobacter pylori* eradication efficacy: a systematic review and meta-analysis. *Helicobacter*. 2020;25(4):e12714.
DOI: https://doi.org/10.1111/hel.12714
19. Gatta L., Scarpignato C., Fiorini G., et al. Impact of primary antibiotic resistance on the effectiveness of sequential therapy for *Helicobacter pylori* infection: lessons from a 5-year study on a large number of strains. *Aliment. Pharmacol. Ther*. 2018;47(9):1261–9. DOI: https://doi.org/10.1111/apt.14597
20. Полякова В.В., Бодунова Н.А., Цапкова А., Бордин Д.С. Резистентность *Helicobacter pylori* к антибиотикам и возможности оптимизации эрадикационной терапии. *Эффективная фармакотерапия*. 2024;20(46):36–44. Polyakova V.V., Bodunova N.A., Tsapkova L.A., Bordin D.S. *Helicobacter pylori* resistance to antibiotics and possibilities for optimization of eradication therapy. *Effective Pharmacotherapy.* 2024;20(46):36–44.
DOI: https://doi.org/10.33978/2307-3586-2024-20-46-36-44
EDN: https://elibrary.ru/motwfv
21. Tuan V.P., Narith D., Tshibangu-Kabamba E., et al. A next-generation sequencing-based approach to identify genetic determinants of antibiotic resistance in Cambodian *Helicobacter pylori* clinical isolates. *J. Clin. Med*. 2019;8(6):858.
DOI: https://doi.org/10.3390/jcm8060858
22. Chua E.G., Debowski A.W., Webberley K.M., et al. Analysis of core protein clusters identifies candidate variable sites conferring metronidazole resistance in *Helicobacter pylori. Gastroenterol. Rep. (Oxf.)*. 2019;7(1):42–9.
DOI: https://doi.org/10.1093/gastro/goy048

Информация об авторах

Старкова Дарья Андреевна✉ — канд. биол. наук, с. н. с. лаб. идентификации патогенов, с. н. с. лаб. молекулярной эпидемиологии и эволюционной генетики НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, dariastarkova13@gmail.com, https://orcid.org/0000-0003-3199-8689

Гладышев Никита Сергеевич — н. с. лаб. морфологии и патологии опорно-двигательного аппарата НИИ морфологии человека им. акад. А.П. Авцына РНЦХ им. Б.В. Петровского, Москва, Россия, krinege@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-2732-5676

Полев Дмитрий Евгеньевич — канд. биол. наук, с. н. с., зав. лаб. метагеномных исследований НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, polev@pasteurorg.ru, https://orcid.org/0000-0001-9679-2791

Саитова Алина Тимуровна — м. н. с. лаб. метагеномных исследований НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, saitova@pasteurorg.ru, https://orcid.org/0000-0002-5921-0745

Глазунова Ксения Александровна — студентка Санкт-Петербургского государственного университета, Санкт-Петербург, Россия, glazunovak03@mail.ru, https://orcid.org/0009-0009-8001-2143

Егорова Светлана Александровна — д-р мед. наук, зав. лаб. идентификации патогенов НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера, Санкт-Петербург, Россия, egorova@pasteurorg.ru, https://orcid.org/0000-0002-7589-0234

Сварваль Алена Владимировна — канд. мед. наук, с. н. с. лаб. идентификации патогенов НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, Санкт-Петербург, Россия, svarval@pasteurorg.ru, https://orcid.org/0000-0001-9340-4132

Участие авторов: *Старкова Д.А.* — биоинформатический анализ, анализ данных, дизайн исследования, написание рукописи; *Гладышев Н.С.* — биоинформатический анализ и статистический анализ; *Полев Д.Е., Саитова А.Т.* — секвенирование, биоинформатический анализ; *Глазунова К.А.* — анализ данных, визуализация данных; *Егорова С.А.* — администрирование проекта, руководство работой; *Сварваль А.В.* — подготовка материала, культуральные методы, курирование данных. Все авторы подтверждают соответствие своего авторства критериям Международного комитета редакторов медицинских журналов, внесли существенный вклад в проведение поисково-аналитической работы и подготовку статьи, прочли и одобрили финальную версию до публикации.

Статья поступила в редакцию 10.06.2025;
принята к публикации 15.08.2025;
опубликована 28.08.2025

Information about the authors

Daria A. Starkova✉ — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Laboratory of pathogen identification, senior researcher, Laboratory of molecular epidemiology and evolutionary genetics, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, dariastarkova13@gmail.com, https://orcid.org/0000-0003-3199-8689

Nikita S. Gladyshev — researcher, Laboratory of morphology and pathology of the musculoskeletal system, Avtsyn Research Institute of Human Morphology, Petrovsky National Research Centre of Surgery, Moscow, Russia, krinege@mail.ru, https://orcid.org/0000-0003-2732-5676

Dmitrii E. Polev — Cand. Sci. (Biol.), senior researcher, Head, Laboratory of metagenomics research, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, polev@pasteurorg.ru, https://orcid.org/0000-0001-9679-2791

*Alina T. Saitov*a — junior researcher, Laboratory of metagenomics research, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, saitova@pasteurorg.ru, https://orcid.org/0000-0002-5921-0745

Ksenia A. Glazunova — student, Saint Petersburg State University, St. Petersburg, Russia, glazunovak03@mail.ru, https://orcid.org/0009-0009-8001-2143

Svetlana A. Egorova — Dr. Sci. (Med.), Head, Laboratory of pathogen identification, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, egorova@pasteurorg.ru, https://orcid.org/0000-0002-7589-0234

Alena V. Svarval — Cand. Sci. (Med.), senior researcher, Laboratory of pathogen identification, Saint Petersburg Pasteur Institute, St. Petersburg, Russia, svarval@pasteurorg.ru, https://orcid.org/0000-0001-9340-4132

Authors' contribution: D.

Starkova D.A. — bioinformatics, study design and writing the manuscript; *Gladyshev N.S.* — bioinformatics and statistical analysis; *Polev D.E., Saitova A.T.* — sequencing, bioinformatics; *Glazunova K.A.* — data analysis, data vizualization; *Egorova S.A.* —supervision, project administration; *Svarval A.V.* — material preparation, culture methods, data curation. All authors confirm that they meet the International Committee of Medical Journal Editors criteria for authorship, made a substantial contribution to the conception of the article, acquisition, analysis, interpretation of data for the article, drafting and revising the article, final approval of the version to be published.

The article was submitted 10.06.2025;
accepted for publication 15.08.2025;
published 28.08.2025