

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2022

Сварваль А.В., Старкова Д.А., Ферман Р.С.

## ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНА БЕЛКА-АДГЕЗИНА *VABA2* У КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *HELICOBACTER PYLORI*

ФБУН «Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера», 197191, Санкт-Петербург, Россия

Приведены результаты сравнительного анализа эффективности двух наборов праймеров для детекции и оценки распространённости гена *babA2* (контролирует синтез фактора вирулентности функционально-активного белка-адгезина *BabA*) у 52 клинических изолятов *H. pylori*, выделенных от пациентов с хроническим гастритом (ХГ,  $n=32$ ), язвенным поражением двенадцатиперстной кишки (ЯДК,  $n=16$ ) и раком желудка (РЖ,  $n=4$ ) в Санкт-Петербурге. Детекция гена *babA2* проводилась методом ПЦР с использованием 271 п.н.- и 832 п.н.- наборов праймеров с последующим секвенированием продуктов амплификации. Наибольшая доля *babA2*-позитивных штаммов – 90,4% (47/52) выявлена с использованием праймеров для детекции продукта амплификации 271 п.н.; детекция ПЦР-продукта 832 п.н. наблюдалась лишь в 51,9% случаев (27/52), статистически значимые различия не установлены ( $p>0,05$ ). Биоинформационный анализ выявил гомологию секвенированных по Сэнгеру ПЦР-продуктов 271 п.н. и 832 п.н. гена *babA2* с участками генов *babA2*, *babA1* и химерного генома (*babB/babA1*) штаммов *H. pylori*, аннотированных в базе данных NCBI. Вне зависимости от использованного набора праймеров, связь между выявлением гена *babA2* у штаммов *H. pylori* с принадлежностью пациентов к группам с различными формами заболевания (ХГ, ЯДК, РЖ) статистически не значима ( $p>0,05$ ). Анализ сочетания трёх генов вирулентности *babA2*, *cagA*, *vacAs1* не выявил связи *babA2*<sup>+</sup>/*cagA*<sup>+</sup>/*vacAs1*<sup>+</sup> генотипа штаммов *H. pylori* с различными клиническими проявлениями *H. pylori*-инфекции ( $p>0,05$ ). Ни один из двух наборов праймеров (271 п.н., 832 п.н.) не является достаточно надёжным для детекции гена *babA2* с целью оценки вирулентности российских штаммов *H. pylori*.

Ключевые слова: *Helicobacter pylori*; *babA2*; генотипирование; хронический гастрит; язвенная болезнь; рак желудка; *H. pylori*-инфекция.

Для цитирования: Сварваль А.В., Старкова Д.А., Ферман Р.С. Выявление гена белка-адгезина *babA2* у клинических изолятов *Helicobacter pylori*. Клиническая лабораторная диагностика. 2022; 67 (9): 538-543. DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-538-543

Для корреспонденции: Старкова Дарья Андреевна, канд. биол. наук, ст. науч. сотр. лаб. идентификации патогенов, науч. сотр. лаб. мол. эпидемиологии и эволюционной генетики; e-mail: dariastarkova13@gmail.com

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Поступила 11.02.2022

Принята к печати 18.05.2022

Опубликовано 12.09.2022

Svarval A.V., Starkova D.A., Ferman R.S.

### DETECTION OF THE *VABA2* ADHESIN PROTEIN GENE IN *HELICOBACTER PYLORI* CLINICAL ISOLATES

St. Petersburg Pasteur Institute, 197191, Saint Petersburg, Russia

The study compared the effectiveness of two different primer sets for detecting and evaluating the prevalence of the *babA2* gene in 52 *H. pylori* clinical isolates from patients with chronic gastritis ( $n=32$ ), duodenal ulcer ( $n=16$ ) and stomach cancer ( $n=4$ ) in St. Petersburg, Russia. The PCR was used for detection of the *babA2* gene with 271 bp and 832 bp primer sets followed by sequencing of the PCR-amplificons. The largest proportion of *babA2*-positive strains – 90.4% (47/52) was detected using a 271 bp PCR primer set. Detection of the 832 bp PCR positive samples was observed only in 51.9% of cases (27/52). The largest proportion of *babA2*-positive strains – 90.4% (47/52) was detected using 271 bp PCR primer set; detection of 832 bp PCR product was observed only in 51.9% cases (27/52), however, there were no significant differences in the *babA2* gene detection rates ( $p>0.05$ ). Bioinformatic analysis revealed a homology of Sanger sequenced PCR products 271 bp and 832 bp of *babA2* gene with regions of the *babA2*, *babA1*, and chimeric *babA/B* genes of *H. pylori* strains annotated in the NCBI database. Regardless of the primer set used, the presence of *babA2* was not significantly associated with duodenal ulcer nor gastric cancer ( $p>0.05$ ). The combination of the three *babA2*, *cagA*, and *vacAs1* genes did not reveal any association between the presence of *babA2* gene and *cagA/vacAs1* genes in *H. pylori* strains ( $p>0.05$ ). Thus, none of the two primer sets (271 bp and 832 bp) appears sufficiently informative for detecting the *babA2* gene to assess virulence of *H. pylori* Russian strains.

Key words: *Helicobacter pylori*; *babA2* gene; genotyping; gastritis; duodenal ulcer; gastric cancer.

For citation: Svarval A.V., Starkova D.A., Ferman R.S. Detection of the *babA2* adhesin protein gene in *Helicobacter pylori* clinical isolates. *Klinicheskaya Laboratornaya Diagnostika (Russian Clinical Laboratory Diagnostics)*. 2022; 67 (9): 538-543 (in Russ.) DOI: https://doi.org/10.51620/0869-2084-2022-67-9-538-543

For correspondence: Starkova D.A., Ph.D., Senior researcher at Laboratory of Identification of Pathogens, researcher at Laboratory of molecular epidemiology and evolutionary genetics; e-mail: dariastarkova13@gmail.com

#### Information about authors:

Svarval A.V., https://orcid.org/0000-0001-9340-4132;

Starkova D.A., https://orcid.org/0000-0003-3199-8689;

Ferman R.S., https://orcid.org/0000-0001-7661-3725.

Conflict of interests. The authors declare absence of conflict of interests.

Acknowledgment. The study had no sponsor support.

Received 11.02.2022

Accepted 18.05.2022

Published 12.09.2022

**Введение.** *Helicobacter pylori* является этиологическим агентом гастродуоденальных заболеваний человека различной степени тяжести (хронический гастрит, язвенная болезнь желудка и/или язвенное поражение двенадцатиперстной кишки, рак желудка). Развитию *H. pylori*-ассоциированных заболеваний способствует длительная колонизация бактериями желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) за счёт прочного прикрепления *H. pylori* к эпителиальным клеткам [1].

Геном *H. pylori* содержит более 30 генов, кодирующих семейство белков-адгезинов – Helicobacter Outer-Membrane Protein (НОР=OMP), для многих из которых идентифицированы соответствующие рецепторы клеток хозяина [2]. К числу этих белков принадлежат BabA (англ., *Blood group Antigen-Binding Adhesin*) – антигенсвязывающие адгезины групп крови (ABO). Описаны три паралога *bab* – BabA, BabB, BabC. Наиболее изученный белок BabA обеспечивает связывание бактерий с фукозилированным антигеном Lewis-b ( $Le^b$ ) и другими антигенами ABO на поверхности эпителиальных клеток ЖКТ, что повышает вирулентность *H. pylori* [2, 3].

Функционально активный белок BabA кодируется геном *babA2*; аллельный вариант *babA1* содержит делецию 10 п.н. в сайте инициации трансляции, в результате чего продукт данного гена не взаимодействует с антигенами  $Le^b$ . Присутствие *babA2* в геноме *H. pylori* связывают с повышенным риском развития язвы двенадцатиперстной кишки и аденокарциномы желудка человека, штаммы *babA2*<sup>+</sup> могут различаться по уровню продукции белка BabA [4, 5]. Регуляцию экспрессии BabA обеспечивают механизмы рекомбинации (внутригеномные транслокации) в области гомологичных N- и C-терминальных участков генов *babA* и *babB*, что приводит к образованию различных вариантов химер *babA/babB* и химерных белков, обладающих различными уровнями функциональной активности [3, 6].

Ряд исследователей указывают на взаимосвязь между статусом *babA2*<sup>+</sup> и присутствием детерминант вирулентности *cagA* и *vacAs1* в геноме клинических изолятов *H. pylori*, ассоциации «трижды-положительных» штаммов (*babA2*<sup>+</sup>/*cagA*<sup>+</sup>/*vacAs1*<sup>+</sup>) с развитием язвы и рака желудка [7-10].

Детекция гена *babA2* проводится с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) с использованием двух наиболее распространённых наборов праймеров. Праймеры, сконструированные Gerhard et al. (1999), используют для амплификации полиморфного участка (832 п.н.) гена *babA2* с целью выявления делеции 10 п.н., которая позволяет различать *babA1* и *babA2* [7]. Другая пара праймеров (разработана Sheu et al., 2003) амплифицирует полиморфный фрагмент (271 п.н.) в промоторной области гена *babA2* [11]. При использовании различных наборов праймеров наблюдаются различия в определении превалентности гена *babA2* в популяциях возбудителя, что существенно влияет на оценку клинической значимости выявления данного гена у изолятов *H. pylori* [4].

Цель исследования – сравнительный анализ эффективности двух наборов праймеров для детекции и оценки распространенности гена *babA2* у клинических изолятов *H. pylori* в Санкт-Петербурге.

**Материал и методы.** Изучены 52 штамма *H. pylori*, выделенные от пациентов с *H. pylori*-ассоциированными заболеваниями: 32 – с хроническим гастритом (ХГ), 16 – с язвенным поражением двенадцатиперстной кишки (ЯДК), четырёх больных раком желудка (РЖ) за период с 2014 по 2019 гг. в ФБУН «Санкт-Петербургский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробио-

логии им. Пастера» (СПбНИИЭМ). Средний возраст пациентов составлял 44 года (от 17 до 88 лет). Исследование одобрено независимым локальным этическим комитетом ФБУН НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера (протокол № 50 /04-2019, 22.06.2020).

Бактериологическому исследованию подлежали полученные при эндоскопии биоптаты слизистой оболочки антрального отдела желудка. Культивирование *H. pylori* осуществляли на селективной среде на основе Колумбийского агара (с добавлением 5-7% дефибринированной лошадиной крови и 1% раствора IsoVitalex) при 37° С. Посевы инкубировали в микроаэрофильных условиях (содержание кислорода ~5%) с использованием анаэроэроэстатов системы GasPac 100. Видимый рост культур бактерий наблюдали в течение 5-7 дней. Для первичной идентификации мазки из колоний окрашивали по Граму. Видовую идентификацию клинических изолятов проводили с использованием биохимических тестов (уреазный, каталазный, оксидазный). При положительном результате трёх тестов культуру идентифицировали как *H. pylori*.

Хромосомную ДНК из чистых культур *H. pylori* выделяли с помощью набора «Хеликопол II» (НПФ «Литех», Москва) и использовали для постановки ПЦР с целью детекции гена *babA2*. Амплификацию проводили в термоциклере Bio-Rad C1000 Thermal Cycler (США). Нуклеотидные последовательности праймеров, температура отжига и характеристика продуктов амплификации приведены в табл. 1. Условия проведения ПЦР: 95° С – 3 мин.; 35 циклов: 94° С – 30 сек., температура отжига – 40 сек., 72° С – 45 сек.; 72° С – 5 мин. Продукты ПЦР разделяли в 2%-ном агарозном геле, окрашенном бромистым этидием. Размер продуктов амплификации определяли с использованием маркёров молекулярной массы 100 bp DNA Ladder (ООО «Интерлабсервис», г. Москва). Результаты визуализировали с помощью системы документации гелей «GelDoc» (BioRad, США).

Секвенирование (по Сэнгеру) шести продуктов амплификации проводили с использованием «Big Dye Terminator v3.1» (Applied Biosystems, США) согласно инструкции производителя. Капиллярный электрофорез выполняли на автоматическом секвенаторе «ABI PRISM 3130» (Applied Biosystems, США). Обработка хроматограмм секвенирования проведена с использованием пакета программ Unipro UGENE 38.1 (Россия). Полиморфизм гена *babA2* оценивали путём сравнения полученных последовательностей с базой секвенированных геномов штаммов *H. pylori*, используя ресурс – BLAST (англ., Basic Local Alignment Search Tool), NCBI (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Степень генетического родства между штаммами на основе полиморфизма участка гена *babA2* оценивали с использованием алгоритма Neighbour-Joining и графически отображали в виде дендрограммы, построенной с помощью программы MEGA v. X.

Статистическую обработку результатов исследования проводили с использованием ресурса «Медицинская статистика» (<https://medstatistic.ru/calculators.html>). Категориальные данные описывались с указанием абсолютных значений и процентных долей. Сравнение процентных долей при анализе четырёхпольных таблиц сопряжённости выполнялось с помощью критерия хи-квадрат ( $\chi^2$ ) Пирсона и точного критерия Фишера. Различия между группами считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

**Результаты.** Видимый рост бактерий на селективной среде, окраска по Граму (изогнутые граммотрица-

Таблица 1  
**Праймеры для ПЦР-детекции гена *babA2***

Праймер	Последовательность	Температура отжига праймеров, °С	Размер ПЦР продукта, п.н.	Ссылка
<i>babA2F</i>	aatccaaaaaggagaaaaagtatgaaa	54	832	7
<i>babA2R</i>	tgttagtgatttcgggtgtaggaca			
<i>bab7-F</i>	ccaaacgaaacaaaaagcgt	45	271	11
<i>bab7-R</i>	gcttggtgtaaaagccgtcgt			

Таблица 2  
**Детекция участков гена *babA2* (271 п.н. и 832 п.н.) двумя наборами праймеров**

Статус гена	832 п.н.	
	<i>babA2</i> <sup>+</sup> (n=27)	<i>babA2</i> <sup>-</sup> (n=25)
271 п.н.	<i>babA2</i> <sup>+</sup> (n=47)	26
	<i>babA2</i> <sup>-</sup> (n=5)	1

Таблица 3  
***babA2*-позитивные штаммы *H. pylori* при различных формах инфекции**

Ген <i>babA2</i> <sup>+</sup>	ХГ, N(%) (n=32)	ЯДК, N(%) (n=16)	РЖ, N(%) (n=4)	$\chi^2$	<i>p</i>
271 п.н.	31 (96,9)	13 (81,3)	3 (75,0)	4,177	0,12
832 п.н.	16 (50,0)	9 (56,3)	2 (50,0)	0,173	0,92

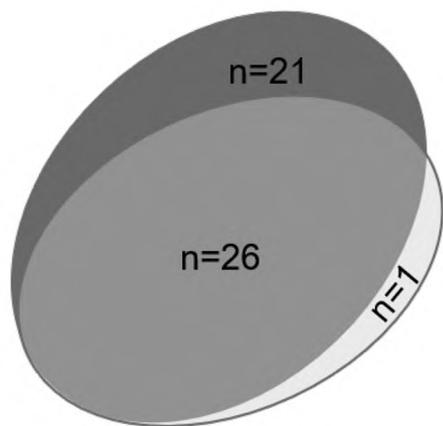


Рис. 1. Диаграмма Венна, отображающая комбинации статусов гена *babA2*, определённых с использованием 832 п.н. (□) и 271 п.н. (■) наборов праймеров. Комбинация *babA2*-негативных штаммов с использованием 832 п.н. и 271 п.н. наборов праймеров (n=4) не показана.

тельные палочки), положительные результаты биохимических тестов (каталаза/уреаза/цитохромоксидаза) позволили отнести 52 штамма бактерий к виду *H. pylori*.

Анализ продуктов амплификации с использованием двух наборов праймеров для детекции участков гена *babA2* размером 832 п.н. и 271 п.н. выявил различия у штаммов *H. pylori* данной выборки (табл. 2).

Наибольшая доля *babA2*-позитивных штаммов – 90,4% (47/52) выявлена с использованием набора праймеров для детекции продукта амплификации размером 271 п.н. Детекция ПЦР-продукта размером 832 п.н.

наблюдалась лишь в 51,9% случаев (27/52). Двадцать один штамм *H. pylori* явился *babA2*-негативным при использовании 832 п.н.-набора праймеров, но *babA2*-позитивным при использовании 271 п.н.-набора праймеров. Один из 832 п.н.-позитивных штаммов *H. pylori* набор праймеров для детекции 271 п.н. дал отрицательный результат. При анализе результатов выявления гена *babA2* у штаммов *H. pylori* в зависимости от набора праймеров статистически значимые различия не установлены:  $p > 0,05$  (использован точный критерий Фишера (двусторонний)). Результаты исследования представлены на рис. 1.

Характеристика распределения *babA2*-позитивных штаммов возбудителя (с использованием двух пар праймеров) у пациентов с различными клиническими проявлениями *H. pylori*-инфекции представлена в табл. 3. Вне зависимости от использованного набора праймеров связь между выявлением гена *babA2* у штаммов *H. pylori* и принадлежностью пациентов к группам с различными формами заболевания статистически не значима ( $p > 0,05$ ; критическое значение  $\chi^2$  при двух степенях свободы и уровне значимости  $p < 0,05$  составляет 5,991).

Секвенирование продукта амплификации 271 п.н. штаммов НР64, НР73, НР95, НР271 показало 98% гомологию нуклеотидных последовательностей (208 из 211) участку генома штамма *H. pylori* Lithuania75 (GenBank acc. no. CP002334.1) (рис. 2).

Гомология нуклеотидных последовательностей исследуемых штаммов и референс-последовательности гена *babA2* *H. pylori* NCTC11637 (=ATCC 43504=CCUG 17874 (GenBank acc. no. AF033654.1)) составила 96,3%. При дальнейшем поиске гомологов искомая последовательность обнаружена в геномах других аннотированных штаммов *H. pylori* – в нескольких участках, которые относятся не только к генам *babA2*, но и *babA1*, *babB* и псевдогенам с одинаковым уровнем сходства. Это может быть связано с особенностями нуклеотидных последовательностей (многочисленные повторы) в промоторной области генов, которые амплифицируются с использованием 271 п.н.- набора праймеров.

В результате секвенирования ПЦР-продуктов размером 832 п.н. у штаммов НР64 и НР789 выявлена вариабельность нуклеотидных последовательностей данного участка гена *babA2*. Последовательности амплифицированных участков на 93,6% и 93,9% гомологичны участкам генома штаммов *H. pylori* 476-A2-EK2 и 476-A-EK5 (GenBank acc. no. CP032473.1, CP032900.1), выделенных в Германии. Гомология нуклеотидных последовательностей исследуемых штаммов и референсной последовательности гена *babA2* *H. pylori* NCTC11637 (=ATCC 43504=CCUG 17874 (GenBank acc. no. AF033654.1)) составила 93,2% и 93,7% соответственно. С геном *babA1* этого же референсного штамма (GenBank acc. no. AF001388.1) гомология секвенированных последовательностей аналогична и составила 93,2% и 93,7%.

На основе полиморфизма участков гена *babA2* (832 п.н.), проведён анализ филогенетического родства штаммов *H. pylori* (рис. 3).

Штаммы *H. pylori* образовали на филогенетическом дереве две обособленные ветви (кластеры) А и В. Монофилетический кластер В с высоким уровнем bootstrap-поддержки (100%) объединял референсные последовательности гена *babB*. Ветвь А объединяла референсные

		Strand: Plus/Minus	
HP271	1	AAAATTTTAAAGAAAATGACaaaaaaaaaaaaCGCTTTATGCTATAATACTCCAATAACA	60
CP002334.1	903586	.....	903527
HP271	61	TTCCAATGCAAATGCATTCTAATGCAAATGTATAATGAATGTGAAATCCCTAATACTA	120
CP002334.1	903526	.....TT-.....	903468
CDS: Putative	1		M K K H I L S L T L G
HP271	121	ATCCAATTTAATCCAAAAGGAGAAAACATGAAAAACACATCCTTTCATTAACTTTAGG	180
CP002334.1	903467	.....	903408
CDS: omp28	1		M K K H I L S L T L G
CDS: Putative	12	S L L V S T L S A E	
HP271	181	CTCGCTTTAGTTTCCACTTTGAGCGCTGAA	211
CP002334.1	903407	.....	903377
CDS: omp28	12	S L L V S T L S A E	

Рис. 2. Выравнивание нуклеотидных последовательностей промоторного участка гена *babA2* штамма *H. pylori* Lithuania75 (GenBank асс. no. CP002334.1) и штамма HP271. Идентичные нуклеотиды обозначены точками. Цифрами обозначены нуклеотидные позиции в геноме *H. pylori* Lithuania75.

последовательности близкородственных генов *babA2* и *babA1*, химерную последовательность двух генов *H. pylori* – *babB/babA1* fusion gene, которая являлась ближайшим соседом по отношению к секвенированным последовательностям штаммов HP64 и HP789 (гомология штаммов HP64, HP789 и *H. pylori* *babB/babA1* fusion gene составила 92,9% и 93,5%).

В предыдущем исследовании нами выявлена взаимосвязь между присутствием гена *cagA* и аллельным вариантом *s1* гена *vacA* у штаммов данной выборки. Объединив имеющиеся данные, мы провели анализ сочетания трёх генов *babA2*, *cagA*, *vacAs1*, в результате которого связи между наличием гена *babA2* и присутствием генов *cagA* и *vacAs1* у штаммов *H. pylori* не выявлено ( $p > 0,05$ ) (табл. 4).

Распределение генотипа *babA2*<sup>+</sup>/*cagA*<sup>+</sup>/*vacAs1*<sup>+</sup> штаммов возбудителя (с использованием двух пар праймеров) у пациентов с различными формами инфекции представлено в табл. 5. Связь между выявлением *babA2*<sup>+</sup>/*cagA*<sup>+</sup>/*vacAs1*<sup>+</sup> штаммов *H. pylori* с различными клиническими проявлениями *H. pylori*-инфекции статистически не значима ( $p > 0,05$ ).

**Обсуждение.** Сравнительный анализ двух наборов праймеров, используемых для детекции гена *babA2* у клинических изолятов *H. pylori*, выявил различия полученных результатов: доля *babA2*-позитивных штаммов с использованием праймеров для амплификации участка 271 п.н. в 1,7 раза превышала таковую при использовании 832 п.н.-набора праймеров (90,4% против 51,9%), однако статистически значимые различия не установлены ( $p > 0,05$ ).

Результаты секвенирования ПЦР-продуктов двух участков (271 п.н. и 832 п.н.) гена *babA2* позволили выявить неспецифичность используемых праймеров в обоих случаях. Показано, что 271 п.н.- и 832 п.н.- наборы праймеров амплифицируют не только ген *babA2*, но также *babA1*, *babB* и псевдогены, что ведёт к появлению ложноположительных результатов. Полученные данные согласуются с исследованиями А. Šterbens и соавт. [4].

Чувствительность 832 п.н.-набора праймеров составляет менее 50% (36-49%) [12]. Столь низкий уровень чувствительности отразился на одинаковом уровне гомологии секвенированных последовательностей *H. pylori* с генами *babA2* и *babA1* в нашем исследовании. Филогенетический анализ показал, что ближайшим соседом к последовательностям российских штаммов является химерная последовательность *H. pylori* *babB/babA1* fusion gene, в которой отсутствует дифференциация между генами *babA* и *babB*. Рекомби-

национные события между двумя близкородственными генами *babA* и *babB* являются результатом адаптивного ответа и распространены в естественной среде у клинических изолятов *H. pylori* [6].

В многочисленных исследованиях зарубежных авторов, посвящённых генетическому разнообразию *H. pylori*, выявлен разный уровень распространённости *babA2*-позитивных штаммов в зависимости от географического региона. Наименьшая доля (менее 50%) *babA2*-позитивных штаммов выявлена в Португалии (12%), США (36%), Мексике (8%), Франции (49%), Италии (36%), Швеции (40%), Болгарии (48%) [10, 13-18]. Максимальный уровень детекции гена *babA2* (80-100%) наблюдался у штаммов, выделенных в Индии, Таиланде, Тайване, Малайзии, Венесуэле [19-23]. В большинстве случаев в странах с высоким уровнем выявляемости гена *babA2* (около 95-100%) использованы набор праймеров для детекции 271 п.н. ПЦР-продукта. Имеющиеся в литературе данные об уровне распространённости и клинической значимости гена *babA2* следует интерпретировать с осторожностью.

В литературе представлена единственная публикация, посвящённая детекции гена *babA2* у российских штаммов *H. pylori* с использованием 832 п.н.-набора праймеров [24]. Согласно результатам исследования, доля *babA2*-позитивных штаммов *H. pylori* у больных ЯДК и ХГ суммарно составляла 74% (31/42). В исследованиях других отечественных авторов выявление гена *babA2* в клинических изолятах или непосредственно из биопсийного материала осуществлялось с использованием «коммерческого набора праймеров «Литех» (Россия)» без указания размера амплифицируемого участка. В данных исследованиях наличие гена *babA2* *H. pylori* выявлено в 19% (Казань), 39% (Москва), 52% (Ростов) случаев [25-27].

Данные об ассоциации гена *babA2* с тяжестью клинических проявлений *H. pylori*-инфекции противоречивы. Установлена корреляция между статусом *babA2*<sup>+</sup> (с использованием 832 п.н.-набора праймеров, но не 271 п.н.) и степенью активного воспаления, однако ассоциации *babA2*-позитивных штаммов с атрофией желудка и кишечной метаплазией авторами не выявлено [4]. Приводятся данные не только о корреляции *babA2*-позитивных штаммов *H. pylori* с язвенной болезнью и раком желудка, но и взаимосвязи статуса *babA2*<sup>+</sup> с присутствием генов *cagA* и *vacAs1*, ассоциации комбинированного генотипа *babA2*<sup>+</sup>/*cagA*<sup>+</sup>/*vacAs1*<sup>+</sup> *H. pylori* с развитием тяжёлых форм инфекции [9, 14, 16, 17].



Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное с использованием алгоритма Neighbour-Joining на основе сравнения нуклеотидных последовательностей 832 п.н.- участка гена *babA2* штаммов *H. pylori*. Масштаб дерева соответствует эволюционным расстояниям, которые рассчитаны с использованием модели Jukes-Cantor. Цифрами показана достоверность ветвления с помощью bootstrap-анализа. Секвенированные последовательности участка гена *babA2* двух штаммов *H. pylori* подчеркнуты линиями.

Таблица 4

Доли гена *babA2* у аллельных вариантов *vacAs1* и *vacAs2* и гена *cagA* у *babA2*-позитивных штаммов *H. pylori* (при использовании двух наборов праймеров 271 п.н. и 832 п.н.)

Ген <i>babA2</i>	<i>cagA</i> <sup>+</sup> , N(%) (n=31)	<i>cagA</i> , N(%) (n=21)	<i>p</i>	<i>vacAs1</i> <sup>+</sup> , N(%) (n=39)	<i>vacAs2</i> <sup>+</sup> , N(%) (n=13)	<i>p</i>
271 п.н. <i>babA2</i> <sup>+</sup> (n=47)	29 (93,5)	18 (85,7)	0,35	35 (89,4)	12 (92,3)	0,79
832 п.н. <i>babA2</i> <sup>+</sup> (n=29)	18 (58,1)	9 (42,8)	0,28	23 (58,9)	4 (30,8)	0,08

Таблица 5

Доли комбинированного генотипа *babA2*<sup>+</sup>/*cagA*<sup>+</sup>/*vacAs1*<sup>+</sup> штаммов *H. pylori* при различных формах инфекции (при использовании двух наборов праймеров 271 п.н. и 832 п.н.)

Генотип	ХГ, N(%) (n=32)	ЯДК, N(%) (n=16)	РЖ, N(%) (n=4)	$\chi^2$	<i>p</i>
271 п.н. <i>babA2</i> <sup>+</sup> / <i>cagA</i> <sup>+</sup> / <i>vacAs1</i> <sup>+</sup>	16 (50,0)	11 (68,7)	1 (25,0)	2,960	0,23
832 п.н. <i>babA2</i> <sup>+</sup> / <i>cagA</i> <sup>+</sup> / <i>vacAs1</i> <sup>+</sup>	9 (28,1)	7 (43,7)	1 (25,0)	1,300	0,52

В нашем исследовании статистически значимых различий в распределении гена *babA2* (по результатам ПЦР с 271 п.н.- и 832 п.н.- наборами праймеров) между группами пациентов не выявлено. Не выявлено ассоциации комбинированного генотипа *babA2<sup>+</sup>/cagA<sup>+</sup>/vacAsI<sup>+</sup>* с тяжестью клинических проявлений *H. pylori*-инфекции, что согласуется с результатами исследований в России [25-27] и большинстве стран (Беларусь, Таиланд, Венесуэла, Мексика, Португалия, Франция) [13, 15, 18, 19, 23, 28].

Исследования продемонстрировали, что ни один из двух наборов праймеров (271 п.н., 832 п.н.) не является достаточно надёжным для детекции гена *babA2* у клинических изолятов *H. pylori*. Полученные данные ставят вопрос о целесообразности использования наборов праймеров, амплифицирующих фрагменты 271 п.н. и 832 п.н. для выявления гена *babA2* с целью оценки вирулентности российских штаммов *H. pylori*.

#### ЛИТЕРАТУРА (пп. 1-24 см. REFERENCES)

- Березняк Е.А., Сорокин В.М., Карпова И.О., Ступина Н.А., Терентьев А.Н. Особенности генотипов штаммов *Helicobacter pylori*, циркулирующих в Ростовской области. *Эпидемиология и Вакцинопрофилактика*. 2013; 4(71):30-3.
- Говорун В.М., Момыналиев К.Т., Смирнова О.В., Челышева В.В., Кудрявцева Л.В., Сергиенко В.И. и др. Современные подходы к молекулярной диагностике и типированию клинических изолятов *Helicobacter pylori* в России. *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии*. 2002; 12(3):57-65.
- Ахтереева А. Р., Давидюк Ю.Н., Файзуллина Р.А., Ивановская К.А., Сафин А.Г., Сафина Д.Д. и др. Распространённость генотипов *Helicobacter pylori* у пациентов с гастродуоденальной патологией в Казани. *Казанский медицинский журнал*. 2017; 98(5):723-8. DOI: 10.17750/KMJ2017-723.
- Макаренко Е.В., Воропаева А.В. Гены *vacA*, *cagA* и *babA Helicobacter pylori* у больных дуоденальной язвой и хроническим гастритом. *Вестник Витебского государственного медицинского университета*. 2004; 3(1):74-7.

#### REFERENCES

- de Brito B.B., da Silva F.A.F., Soares A.S., Pereira V.A., Santos M.L.C., Sampaio M.M., et al. Pathogenesis and clinical management of *Helicobacter pylori* gastric infection. *World J. Gastroenterol*. 2019; 25(37):5578-89. DOI: 10.3748/wjg.v25.i37.5578.
- Xu C., Soyfoo D.M., Wu Y., Xu S. Virulence of *Helicobacter pylori* outer membrane proteins: an updated review. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2020; 39:1821-30. DOI: 10.1007/s10096-020-03948-y.
- Ilver D., Arnqvist A., Ögren J., Frick I.M., Kersulyte D., Incecik E.T., Berg D.E., Covacci A., Engstrand L. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science*. 1998; 279(5349):373-7. DOI:10.1126/science.279.5349.373.
- Šterbenc A., Lunar M.M., Homan M., Luzar B., Zidar N., Poljak M. Prevalence of the *Helicobacter pylori babA2* gene in children mainly depends on the PCR primer set used. *Can. J. Infect. Dis. Med. Microbiol*. 2020;4080248. DOI:10.1155/2020/4080248.
- Yamaoka Y. Roles of *Helicobacter pylori* BabA in gastroduodenal pathogenesis. *World J. Gastroenterol*. 2008; 14(27):4265-72. DOI:10.3748/wjg.14.4265
- Pride D.T., Blaser M.J. Concerted evolution between duplicated genetic elements in *Helicobacter pylori*. *Mol. Biol*. 2002; 316:629-42. DOI:10.1006/jmbi.2001.5311.
- Gerhard M., Lehn N., Neumayer N., Borén T., Rad R., Schepp W. et al. Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigenbinding adhesion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1999; 96(22):12778-83. DOI: 10.1073/pnas.96.22.12778.
- Lee D.-H., Ha J.-H., Shin J.-I., Kim K.-M., Choi J.-G., Park S. et al. Increased risk of severe gastric symptoms by virulence factors *vacAsIc*, *alpA*, *babA2*, and *hopZ* in *Helicobacter pylori* infection. *J. Microbiol. Biotechnol*. 2021; 31(3):368-79. DOI: 10.4014/jmb.2101.01023.
- Torres L.E., Melián K., Moreno A., Alonso J., Sabatier C.A., Hernández M. et al. Prevalence of *vacA*, *cagA* and *babA2* genes in Cuban *Helicobacter pylori* isolates. *World J. Gastroenterol*. 2009;

- 15(2):204-10. DOI:10.3748/wjg.15.204.
- Olfat F.O., Zheng Q., Oleastro M., Volland P., Borén T., Karttunen R. et al. Correlation of the *Helicobacter pylori* adherence factor BabA with duodenal ulcer disease in four European countries. *FEMS Immunol. Med. Microbiol*. 2005; 44(2):151-6. DOI: 10.1016/j.femsim.2004.10.010.
- Sheu B.S., Sheu S.M., Yang H.B., Huang A.H., Wu J.J. Host gastric Lewis expression determines the bacterial density of *Helicobacter pylori* in *babA2* genopositive infection. *Gut*. 2003; 52(7):927-32. DOI:10.1136/gut.52.7.927.
- Fujimoto S., Olaniyi Ojo O., Arnqvist A., Wu J.Y., Odenbreit S., Haas R. et al. *Helicobacter pylori* BabA expression, gastric mucosal injury, and clinical outcome. *Clin. Gastroenterol. Hepatol*. 2007; 5(1):49-58. DOI: 10.1016/j.cgh.2006.09.015.
- Almeida N., Donato M.M., Romãozinho J.M., Luxo C., Cardoso O., Cipriano M.A. et al. Correlation of *Helicobacter pylori* genotypes with gastric histopathology in the central region of a South-European Country. *Dig. Dis. Sci*. 2015; 60:74-85. DOI: 10.1007/s10620-014-3319-8.
- Podzorski R.P., Podzorski D.S., Wuertler A., Tolia V. Analysis of the *vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA*, and *babA2* genes in *Helicobacter pylori* from sixty-one pediatric patients from the Midwestern United States. *Diagn. Microbiol. Infect. Dis*. 2003; 46(2):83-8. DOI: 10.1016/S0732-8893(03)00034-8.
- Lehours P., Menard A., Dupouy S., Bergey B., Richey F., Zerbib F. et al. Evaluation of the association of nine *Helicobacter pylori* virulence factors with strains involved in low-grade gastric mucosa-associated lymphoid tissue lymphoma. *Infect. Immun*. 2004; 72: 880-8. DOI: 10.1128/IAI.72.2.880-888.2004.
- Zambon C.F., Navaglia F., Basso D., Rugge M., Plebani M. *Helicobacter pylori babA2*, *cagA*, and *s1 vacA* genes work synergistically in causing intestinal metaplasia. *J. Clin. Pathol*. 2003; 56(4):287-91. DOI: 10.1136/jcp.56.4.287.
- Boyanova L., Yordanov D., Gergova G., Markovska R., Mitov I. Association of *iceA* and *babA* genotypes in *Helicobacter pylori* strains with patient and strain characteristics. *Antonie van Leeuwenhoek*. 2010; 98:343-50. DOI: https://doi.org/10.1007/s10482-010-9448-y.
- González-Vázquez R., Córdova-Espinoza M.G., Escamilla-Gutiérrez A., Morales-Méndez I., Ochoa-Pérez S.A., Armendáriz-Toledano F., et al. Frequency of virulence genes in mixed infections with *Helicobacter pylori* strains from a Mexican population. *Rev. Gastroenterol. Mex*. 2016; 81(1):11-20. DOI: 10.1016/j.rgmx.2015.10.001.
- Chomvarin C., Namwat W., Chaicumpar K., Mairiang P., Sangchan A., Sripa B. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori vacA*, *cagA*, *cagE*, *iceA* and *babA2* genotypes in Thai dyspeptic patients. *Int. J. Infect. Dis*. 2008; 12(1):30-6. DOI: 10.1016/j.ijid.2007.03.012.
- Elhashima T., Mahmuda M.I.M., Amjad N., Harun N., Alania I.M. Clinical and histopathological relevance of *Helicobacter pylori babA2* genotype. 2016; 15(2):43-9. DOI: 10.31436/imjm.v15i2.388.
- Ghosh P., Sarkar A., Ganguly M., Raghwan, Alam J., De R. et al. *Helicobacter pylori* strains harboring *babA2* from Indian subpopulation are associated with increased virulence in ex vivo study. *Gut Pathog*. 2016; 8(1). DOI: 10.1186/s13099-015-0083-z.
- Lai C.H., Kuo C.H., Chen Y.C., Chao F. Y., Poon S. K., Chang C. S., et al. High prevalence of *cagA* and *babA2*-positive *Helicobacter pylori* clinical isolates in Taiwan. *J. Clin. Microbiol*. 2020; 40(10):3860-2. DOI:10.1128/JCM.40.10.3860-3862.2002.
- Chiurillo M.A., Moran Y., Cañas M., Valderrama E., Granda N., Sayegh M. et al. Genotyping of *Helicobacter pylori* virulence-associated genes shows high diversity of strains infecting patients in western Venezuela. *Int. J. of Inf. Dis*. 2013; 17(9):750-6. DOI: 10.1016/j.ijid.2013.03.004.
- Momynaliev K., Sмирнова О., Кудрявтсева Л., Говорун В. *Helicobacter pylori* Genotypes in Russia. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis*. 2003; 22:573-4. DOI: 10.1007/s10096-003-0987-2.
- Bereznyak E.A., Sorokin V.M., Karpova I.O., Stupina N.A., Terentiev A.N. Genotype Peculiarities of Regional *Helicobacter Pylori* Strains from the Rostov District. *Epidemiologiya i Vaktsinoprofilaktika*. 2013; 4(71):30-3. (in Russian)
- Govorun V.M., Momynaliev K.T., Sмирнова О.В., Челышева В.В., Кудрявцева Л.В., Сергиенко В.И. et al. Modern approaches to molecular diagnosis and genotyping of clinical isolates of *Helicobacter pylori* in Russia. *Rossiyskiy zhurnal gastroenterologii, gepatologii, koloproktologii*. 2002; 12 (3): 57-65. (in Russian)
- Akhtereeva A.R., Davidyuk Y.N., Faizullina R.A., Ivanovskaya K.A., Safin A.G., Safina D.D. et al. Prevalence of *Helicobacter pylori* genotypes in patients with gastroduodenal pathology in Kazan. *Kazanskiy meditsinskiy zhurnal*. 2017; 98(5):723-8. (in Russian)
- Makarenko E.V., Voropaeva A.V. *Helicobacter pylori vacA*, *cagA* and *babA* genes in patients with duodenal ulcer and chronic gastritis. *Vestnik Vitebskogo gosudarstvennogo meditsinskogo universiteta*. 2004; 3(1):74-7. (in Russian)