

БИОЛОГИЧЕСКИЙ МИКРОЧИП ДЛЯ АНАЛИЗА УСТОЙЧИВОСТИ К ТЕТРАЦИКЛИНУ КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *NEISSERIA GONORRHOEA* В РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

Е.И. Дементьева¹, Б.Л. Шаскольский¹, А.Т. Лейнсоо¹, Д.А. Грядунов¹,
Н.П. Петрова², А.В. Честков², А.А. Кубанов², Д.Г. Дерябин²

¹ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, Россия

² ФГБУ Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии Минздрава России, Москва, Россия

Резюме. Проанализированы фенотипическая чувствительность и генетические детерминанты резистентности к тетрациклину у 399 клинических изолятов *Neisseria gonorrhoeae*, собранных в различных регионах РФ в 2015–2017 гг. Оценку фенотипической устойчивости проводили методом серийных разведений в агаре и оценивали по критериям МУК 4.2.1890-04, фиксируя значения минимальной подавляющей концентрации (МПК). Для анализа генетических маркеров резистентности использовали гидрогелевый биочип с иммобилизованными олигонуклеотидными зондами, позволяющий одновременно детектировать ряд хромосомных мутаций и наличие плазмидного гена *tetM*, ассоциированных с резистентностью *N. gonorrhoeae* к тетрациклину. Детерминанты устойчивости были идентифицированы у 193 изолятов (48,4%). Наиболее часто встречались замены в кодоне 57 гена *rpsJ* (41,2%), уменьшающие аффинность тетрациклина к 30S субъединице рибосомы, в основном, мутация Val57Met, как в виде одиночной замены, так и в сочетании с другими мутациями. Замены в данном гене приводили к появлению умеренно-резистентных штаммов. Второй по частоте встречаемости (23,1%) оказались мутации в гене *porB* (нарушение поступления антибиотика в клетку); при этом замена Gly120Lys, как правило, приводила к появлению резистентности к тетрациклину, как в случае единичной мутации, так и в совокупности с другими заменами. Другие мутации в кодоне 120 (Gly на Asp, Asn или Thr), а также замены Ala121 на Asp, Asn и Gly оказывали значительно меньшее влияние на уровень устойчивости. У 11,3% штаммов наблюдалась делеция аденина в –35 положении в промоторной области гена *mtrR* (увеличение экспрессии помпы эффлюкса MtrC–MtrD–MtrE). Ген *tetM* был выявлен в 27 изолятах, в том числе, американского типа — в 17 штаммах, голландского типа — в 10, для которых построено филогенетическое дерево с оценкой гомологии с аналогичными генами у микроорганизмов из родов *Streptococcus*, *Enterococcus* и *Mycoplasma*. Мутации в хромосомных генах приводили к увеличению МПК тетрациклина до 2–4 мг/л; максимальную МПК — 4 мг/л наблюдали при одновременном присутствии нескольких мутаций. Изоляты, несущие плазмиду с геном *tetM*, демонстрировали высокий уровень устойчивости (МПК ≥ 8 мг/л, у двух образцов — 64 мг/л). Долговременный отказ от использования тетрациклина для лечения гонококковой инфекции (с 2003 г.) привел к снижению доли резистентных

Адрес для переписки:

Дементьева Екатерина Игоревна
119991, Россия, Москва, ул. Вавилова, 32, Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН.
Тел.: 8 (499) 135-98-46 (служебн.).
E-mail: kdem@biochip.ru

Contacts:

Ekaterina I. Dementieva
119991, Russian Federation, Moscow, Vavilova str., 32, Engelhardt Institute of Molecular Biology.
Phone: +7 (499) 135-98-46 (office).
E-mail: kdem@biochip.ru

Библиографическое описание:

Дементьева Е.И., Шаскольский Б.Л., Лейнсоо А.Т., Грядунов Д.А., Петрова Н.П., Честков А.В., Кубанов А.А., Дерябин Д.Г. Биологический микрочип для анализа устойчивости к тетрациклину клинических изолятов *Neisseria gonorrhoeae* в Российской Федерации // Инфекция и иммунитет. 2019. Т. 9, № 5–6. С. 750–762. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-750-762

Citation:

Dementieva E.I., Shaskolskiy B.L., Leinsoo A.T., Gryadunov D.A., Petrova N.P., Chestkov A.V., Kubanov A.A., Deryabin D.G., Biological microchip for assessing tetracycline-resistance in *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates in Russian Federation // Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet, 2019, vol. 9, no. 5–6, pp. 750–762. doi: 10.15789/2220-7619-2019-5-6-750-762

Работа выполнена за счет гранта Российского научного фонда (проект № 17-75-20039) и Государственного задания Минздрава России (№ 056-00015-18-00).

© Дементьева Е.И. и соавт., 2019

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2019-5-6-750-762>

штаммов, включая умеренно резистентные, с 75 до 45,4%, однако устойчивость к тетрациклину в настоящее время в РФ остается на высоком уровне, что определяется сохранением различных детерминант резистентности у половины изолятов в исследованной выборке.

Ключевые слова: *Neisseria gonorrhoeae*, тетрациклин, генетические детерминанты резистентности, хромосомные мутации, ген *tetM*, биочип, минимальная подавляющая концентрация.

BIOLOGICAL MICROCHIP FOR ASSESSING TETRACYCLINE-RESISTANCE IN *NEISSERIA GONORRHOEAE* CLINICAL ISOLATES IN RUSSIAN FEDERATION

Dementieva E.I.^a, Shaskolskiy B.L.^a, Leinsoo A.T.^a, Gryadunov D.A.^a, Petrova N.P.^b, Chestkov A.V.^b, Kubanov A.A.^b, Deryabin D.G.^b

^a Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, Russia

^b State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Russian Ministry of Health, Moscow, Russia

Abstract. A total of 399 *Neisseria gonorrhoeae* clinical isolates collected in different regions of the Russian Federation in 2015–2017 were analyzed for tetracycline susceptibility and genetic markers of resistance. Drug susceptibility testing was performed by serial dilution method in agar and minimum inhibitory concentration (MIC) was measured according to the Russian “Guidelines for microbial susceptibility testing for antibacterial agents No. 4.2.1890-04”. Tetracycline resistance determinants were studied by using hydrogel microarray with immobilized oligonucleotide probes able to identify a series of chromosomal mutations and detect plasmid *tetM* gene. Different resistance determinants were found in 193 isolates (48.4%). Mutation in codon 57 in the *rpsJ* gene (41.2%) was most common that decreases tetracycline affinity to ribosome 30S subunit, mainly due to Val57Met substitution both as a point mutation as well as in combination with others. Mutations in the *rpsJ* gene were found in strains with the intermediate tetracycline susceptibility. Mutations in the *porB* gene (lower tetracycline influx) held the second place in prevalence pattern (23.1%); the Gly120Lys substitution usually led to emergence of tetracycline resistance either as a point mutation or in combination with other substitutions. Substitutions of Gly120 for other residues (Asp, Asn, and Thr) and Ala121 for Asp, Asn, and Gly had much less effect on resistance level. The –35 delA deletion in the promoter region of *mtrR* gene (increased expression of MtrC–MtrD–MtrE efflux pump) was observed in 11.3% strains. The *tetM* gene was found in 27 strains including 17 American and 10 Dutch type *tetM* determinants. Evolutionary tree was constructed for the *tetM* genes with the estimation of their homology with similar genes in genera *Streptococcus*, *Enterococcus* and *Mycoplasma*. Mutations in chromosomal genes resulted in increase of tetracycline MIC up to 2–4 mg/L; 4 mg/L MIC was observed in case of simultaneous presence of several mutations. Strains bearing *tetM* gene-containing plasmid showed extremely high resistance level: MIC ≥ 8 mg/L (64 mg/L for the two samples). Thus, long-lasting withdrawal of tetracycline use for treatment of gonococcal infections in Russia (since 2003) resulted in decreased percentage of resistant strains (including strains with intermediate susceptibility) from 75% down to 45.4%. However, currently tetracycline resistance in Russia remains elevated that is explained by the presence of different resistance determinants in the half of isolates under study.

Key words: *Neisseria gonorrhoeae*, tetracycline, genetic resistance determinants, chromosomal mutations, *tetM* gene, microarray, minimum inhibitory concentration.

Введение

ДНК-микрочипы — массивы иммобилизованных на твердой фазе олигонуклеотидных зондов, способных специфично связываться с детектируемыми последовательностями, в настоящее время стали востребованным инструментом проведения многопараметрического анализа [3, 22], в том числе обеспечивающим одновременную идентификацию генетических детерминант резистентности бактериальных патогенов к широкому спектру антимикробных препаратов. В ИМБ РАН разработаны и успешно используются биологические микрочипы (биочипы) на основе гидрогелей для видовой идентификации микобактерий, обнаружения генетических детерминант множественной и широкой лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза [26, 32, 33], генотипиро-

вания вируса гепатита С [16], анализа генома вируса гриппа, включая выявление состояния генетических маркеров, детерминирующих патогенность вируса и его устойчивость к противовирусным препаратам [2]. Технология гидрогелевых биочипов также была использована для идентификации возбудителей инфекций репродуктивного тракта человека с одновременным анализом генетических детерминант устойчивости к антимикробным препаратам [4, 5, 18].

Перспективным направлением расширения сферы применения гидрогелевых биочипов низкой плотности представляется исследование детерминант резистентности возбудителя гонококковой инфекции — *Neisseria gonorrhoeae*, входящего в список приоритетных бактериальных патогенов по версии ВОЗ от 27 февраля 2017 г. [13]. Возбудитель гонореи относится к микроорганизмам, которые способны быстро

накапливать мутации и приобретать резистентность к лекарственным препаратам, в том числе множественную лекарственную устойчивость. В настоящее время в мире выявлены изоляты *N. gonorrhoeae*, устойчивые ко всем основным препаратам, используемым для лечения гонореи, включая сульфаниламиды, β -лактамы, тетрациклины, фторхинолоны, аминогликозиды, макролиды [28, 30]. Для проведения успешной терапии заболевания и предотвращения распространения лекарственно-устойчивых форм необходим мониторинг чувствительности *N. gonorrhoeae* к основным противомикробным препаратам, когда-либо используемым для терапии гонококковой инфекции.

Одной из групп подобных препаратов являются тетрациклины, широко применявшиеся во всем мире для лечения гонореи в 1960–1980 гг. Однако устойчивость к тетрациклинам сформировалась довольно быстро: появились данные об увеличении МПК тетрациклина для многих штаммов *N. gonorrhoeae*, что объяснялось возникновением мутаций в генах хромосомной локализации. Появление плазмидной детерминанты *tetM* в середине 80-х гг. годов в США [24] и Голландии [12] (американский и голландский тип), вызывающее значительный рост МПК тетрациклина (более 8 мг/л), и ее быстрое распространение по всему миру привели к прекращению использования тетрациклина для лечения гонококковой инфекции.

В России препараты тетрациклинового ряда (тетрациклин, доксициклин) использовались дольше. Лишь в приказе Минздрава № 415 от 20.08.2003 г. «Протокол ведения больных, гонококковая инфекция» тетрациклин перестал указываться в списке препаратов для лечения локализованной гонококковой инфекции и гонококкового фарингита [8]. По результатам, полученным в рамках системы мониторинга антибиотикорезистентности *N. gonorrhoeae* в РФ (известна под названием RU-GASP (Russian Gonococcal Antimicrobial Susceptibility Programme), в 2005–2009 гг. доля резистентных к тетрациклину штаммов *N. gonorrhoeae* в среднем по РФ превышала 75% [1, 6, 9].

Современный этап контроля чувствительности гонококка к тетрациклинам является актуальным по нескольким причинам. Во-первых, для детального понимания механизмов устойчивости необходимо знать, как меняются частоты генетических детерминант резистентности в условиях, когда препарат (в данном случае тетрациклин) не применялся для терапии в течение некоторого количества лет (в данном случае с 2003 г.). Во-вторых, рост устойчивости гонококков ко всему спектру используемых лекарственных препаратов диктует необходимость получения новых лекарств, и, возмож-

но, препаратов на основе ранее используемых. Так, разработаны новые синтетические препараты группы тетрациклинов — тетрациклины третьего поколения, например, тигециклин (глицилциклин), омадациклин (аминометилциклин), эравациклин (фторциклин), которые потенциально применимы для терапии гонококковой инфекции [20, 25].

Установлено, что детерминанты устойчивости *N. gonorrhoeae* к тетрациклину включают как хромосомные мутации, так и экспрессию плазмидного белка TetM [17, 25, 30], а именно:

- специфические мутации гена *rpsJ*, кодирующего белок S10, приводящие к заменам Val57Met или Val57Leu, которые снижают аффинность тетрациклина к 30S субъединице рибосомы;

- мутации гена *penB* (*porB*), кодирующего белок-порин PorB1b (остатки Gly120, Ala121), приводящие к уменьшению поступления antimicrobных препаратов, включая тетрациклин, в бактериальную клетку;

- мутации гена *mtrR*, вызывающие увеличение экспрессии помпы эффлюкса MtrC-MtrD-MtrE, в частности, мутации в промоторной области: инсерции T и TT в положении –10 и делеция A в положении –35;

- наличие конъюгативной плазмиды, несущей ген *tetM*, размером 25,2 MDa (40,6 тыс. п.о.) [23]. Плазмидный белок TetM, сходный по структуре с фактором элонгации EF-G, блокирует сайт связывания тетрациклина на рибосоме, делая ее практически недоступной для взаимодействия с антибиотиком.

Экспрессия плазмидного белка TetM приводит к наибольшей устойчивости к тетрациклинам (МПК 8 мг/л и выше). Хромосомные мутации не вызывают настолько существенного увеличения МПК, однако показано, что триада мутаций *mtrR-porB-rpsJ* обладает высокой эффективностью, приводя к клинически значимому повышению уровня устойчивости [17].

Следует отметить, что спектр геномных маркеров устойчивости *N. gonorrhoeae* к тетрациклину определен достаточно точно, в частности, недавно проведенный полногеномный анализ клинических изолятов *N. gonorrhoeae* с использованием платформы Oxford Nanopore для выявления детерминант резистентности к antimicrobным препаратам включал те же вышеуказанные гены-мишени и наличие плазмиды *tetM* [15].

Целью настоящей работы являлась оценка уровня устойчивости к тетрациклину в современной российской популяции гонококковой инфекции посредством анализа фенотипической чувствительности и идентификации генетических детерминант резистентности *N. gonorrhoeae* в клинических изолятах, полученных в различных регионах Российской Федерации в 2015–2017 гг.

Материалы и методы

Клинические изоляты *N. gonorrhoeae*. В работе исследованы 399 клинических изолятов *N. gonorrhoeae* (уретральные и цервикальные образцы от женщин и уретральные материалы от мужчин), поступивших в 2015–2017 гг. в ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России из специализированных медицинских организаций дерматовенерологического профиля 16 субъектов Российской Федерации (Архангельская, Астраханская, Брянская, Калужская, Новосибирская, Омская, Пензенская, Псковская, Рязанская, Томская и Челябинская области, г. Москва, Ставропольский край, Республика Татарстан, Республика Тыва и Чувашская Республика). Первоначальный посев поступивших культур проводили на шоколадный агар с добавлением 1% ростовой добавки ISOVitalex и 1% селективной добавки VCAT (Becton Dickinson, США). Далее колонии микроскопировали и исследовали с использованием оксидазного теста. Верификацию культур проводили по совокупности биохимических активностей с использованием NH-карт на анализаторе «VITEK 2 Compact» (bioMérieux, Франция). Культуры, показавшие результаты «отлично» (96–99%) и «очень хорошо» (93–95%), идентифицировали как образцы *N. gonorrhoeae*. Для образцов с результатами (вероятностью) менее 93% осуществляли дополнительную масс-спектрометрическую идентификацию микроорганизма на времяпролетном масс-спектрометре с ионизацией «MALDI Microflex» (Bruker Daltonics GmbH, Германия).

Выделение ДНК из чистых культур *N. gonorrhoeae* проводили с использованием экспресс-наборов для выделения ДНК (НПФ «Литех», Москва) и хранили при -20°C .

Определение фенотипической чувствительности *N. gonorrhoeae* к тетрациклину. Чувствительность *N. gonorrhoeae* к тетрациклину анализировали методом серийных разведений, используя в качестве основы шоколадный агар с добавлением 1% ростовой добавки ISOVitalex, определяя значения минимальных подавляющих концентраций (МПК, мг/л). При интерпретации результатов значения определенных МПК сравнивали с критериями МУК 4.2.1890-04 [7]. Согласно данным критериям, исследуемые штаммы *N. gonorrhoeae* относили к категории Ч — чувствительные (МПК $\leq 0,25$ мг/л), У/Р — умеренно резистентные/промежуточно чувствительные (МПК = 0,5–1 мг/л), Р — резистентные (МПК ≥ 2 мг/л).

Олигонуклеотиды для иммобилизации на биочипе и праймеры для амплификации. Конструирование олигонуклеотидов для иммобилизации на биочипе и праймеров для проведения ПЦР-амплификации проводили, как описано

ранее [32, 33]. Синтез олигонуклеотидов для иммобилизации на биочипе и праймеров для амплификации проводили на автоматическом синтезаторе «ABI-394 DNA/RNA synthesizer» (Applied Biosystems, США) с использованием стандартного фосфорамидитного метода и очищали методом обращенно-фазовой ВЭЖХ (комплекс «Gilson», Франция). В процессе синтеза в олигонуклеотидные зонды вводили спейсер со свободной аминогруппой с использованием 5'-Amino-Modifier C6 (Glen Research, США).

Гидрогелевый биочип для анализа мутаций, приводящих к устойчивости к антимикробным препаратам. В работе использовали биочип, разработанный ранее в ИМБ РАН, для одновременного обнаружения 12 возбудителей инфекций репродуктивного тракта человека (*N. gonorrhoeae*, *Treponema pallidum*, *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum*, *Mycoplasma hominis*, *Atopobium vaginae*, *Gardnerella vaginalis*, *Mobiluncus mulieris*, *Bacteroides fragilis* и *Fusobacterium nucleatum*) с одновременным анализом генетических маркеров устойчивости к антимикробным препаратам [5] с модификациями, обеспечивающими идентификацию расширенного спектра детерминант резистентности *N. gonorrhoeae* к тетрациклину. Схема биочипа представлена на рисунке 1. Микрочип включал 143 гидрогелевых элемента:

- элементы, содержащие иммобилизованные зонды, соответствующие видоспецифичному полиморфизму гена 16S рРНК, для идентификации 12 возбудителей;
- элементы, содержащие иммобилизованные зонды, специфичные к дикому типу и мутантным вариантам последовательностей генов, являющихся детерминантами резистентности возбудителей к антимикробным препаратам, включающим гены *penA*, *penA*, *bla*_{TEM} (устойчивость к β -лактамам); 16S рРНК, *rpsJ*, *tetM* (устойчивость к тетрацикламам); 23S рРНК, *mefA* (устойчивость к макролидам); *gyrA*, *parC* (устойчивость к фторхинолонам); *nimB-nimG*, *ntr4tv/ntr6tv* (устойчивость к метронидазолу);
- элементы, содержащие иммобилизованные зонды для идентификации мутаций в генах *porB* и *mtrR* (инсерции Т и ТТ в положении -10 и делеция А в положении -35 промоторной области), отвечающих за проникновение в клетку и эффлюкс ряда лекарственных препаратов;
- элементы с индексом «0», не содержащие иммобилизованных зондов и используемые для вычисления фонового сигнала.

В сравнении с ранее описанным биочипом [5], в его структуру были добавлены олигонуклеотиды для определения мутаций в кодонах 120 и 121 гена *porB*, а также зонд для детекции гена

tetM, являющийся универсальным для выявления американского и голландского вариантов.

Биочипы на основе гидрогелей изготавливали по ранее описанной методике [33].

Проведение анализа ДНК *N. gonorrhoeae* с использованием биочипа. Процедура анализа образцов ДНК *N. gonorrhoeae* включала (а) мультиплексную ПЦР с использованием специфичных праймеров и флуоресцентного субстрата — конъюгата дезоксиуридинтрифосфата и красителя индодикарбоцианинового ряда — аналога Су5, в ходе которой осуществлялась амплификация и флуоресцентное маркирование целевых фрагментов генома; (б) гибридизацию флуоресцентно-меченных ПЦР-продуктов на биочипе с образованием гибридизационных комплексов в элементах биочипа; (в) регистрацию сигналов в элементах биочипа и интерпретацию результатов гибридизации.

Амплификацию и гибридизацию проводили по описанной ранее методике [5].

Регистрацию флуоресцентных изображений ДНК-чипов (гибридизационных картин) выполняли на универсальном аппаратно-программном комплексе (ООО «БИОЧИП-ИМБ», Россия) для анализа биологических микрочипов с использованием специализированного программного обеспечения ImageWare® (ООО «БИОЧИП-ИМБ»). Принадлежность анализируемой ДНК к виду *N. gonorrhoeae* устанавливали при наличии положительного сигнала элемента биочипа, содержащего зонд, соответствующий видоспецифичной последовательности гена 16S рРНК (рис. 1: элементы *N. gonorrhoeae* в группе элементов для идентификации). Идентификацию точечных мутаций в генах *rpsJ*, *porB*, *mtrR* проводили, сравнивая интенсивности сигналов в соответствующих группах элементов с олигонуклеотидами, соответствующими дикому типу и мутантным вариантам данных генов. Присутствие гена *tetM* в анализируемой ДНК определяли по наличию сигнала в соответствующей ячейке, превышающего среднее значение сигналов в элементах, не содержащих иммобилизованных зондов «0», не менее чем в 4,0 раза. Флуоресцентные изображения биочипов после проведения анализа представлены на рисунке 2.

Определение диагностической чувствительности и специфичности биологических микрочипов. Диагностическую чувствительность S_n и специфичность S_p при анализе резистентности клинических изолятов *N. gonorrhoeae* к тетрациклину с использованием биологических микрочипов рассчитывали, сравнивая результаты, полученные на микрочипах, с результатами фенотипического анализа. Устанавливали следующие критерии для результатов:

— истинноположительные (Тр): обнаружены мутации, приводящие к резистентности —

образцы являются резистентными (Р) или умеренно-резистентными (У/Р) к тетрациклину;

— истинноотрицательные (Тн): не обнаружены мутации, приводящие к резистентности — образцы являются чувствительными к тетрациклину;

— ложноположительные (Фр): обнаружены мутации, приводящие к резистентности — образцы являются чувствительными к тетрациклину;

— ложноотрицательные (Fn): не обнаружены мутации, приводящие к резистентности — образцы являются резистентными (Р) или умеренно-резистентными (У/Р) к тетрациклину.

S_n и S_p рассчитывали по формулам:

$$S_n = \frac{T_p}{T_p + F_n} \times 100\%; \quad (1)$$

$$S_p = \frac{T_n}{T_n + F_p} \times 100\%. \quad (2)$$

Секвенирование фрагментов генома *N. gonorrhoeae*. Секвенирование ДНК *N. gonorrhoeae* проводили в ЦКП «Геном» ИМБ РАН с помощью набора реактивов «ABI PRISM BigDye Terminator v.3.1» (Applied Biosystems, США) с последующим анализом продуктов реакции на секвенаторе «Applied Biosystems 3730XL DNA Analyzer».

Определение нуклеотидных последовательностей фрагментов соответствующих локусов генома *N. gonorrhoeae* использовали для подтверждения результатов анализа на биочипах. Для всех образцов, в которых был обнаружен плазмидный ген *tetM*, проводили его секвенирование с целью отнесения аллеля к американскому или голландскому типу. Установление последовательности гена *tetM* проводили с праймерами: 5'-²⁰⁸⁹CCG ACT ATT TGG ACG ACG GG²¹⁰⁸-3' (прямой), 5'-¹³³⁹GTG ACC CGC TTC TGC GAT ATT¹³⁵⁹-3' (обратный), 5'-¹³³⁹AAT ATC GCA GAA GCG GGT CAC¹³⁵⁹-3' (прямой), 5'-⁹⁶⁰GGT CAG TCT GAA CTT TGC GG⁹⁷⁹-3' (обратный), 5'-¹¹⁴⁷ACA ATT TCC CCG GAA TAA GCC T¹¹⁶⁸-3' (прямой), 5'-³²⁷GGA AGC GTG GAC AAA GGT ACA³⁴⁷-3' (обратный). Для американского аллеля *tetM* (GenBank Acc. No L12241) использовали праймеры 5'-¹⁵⁷⁴CTT CCC AAC GGA AGC GGT GAT¹⁵⁹⁴-3' (прямой), 5'-⁹⁶⁰GGT CCG TCT GAA CTT TGC GG⁹⁷⁹-3' (обратный), для голландского аллеля *tetM* (GenBank Acc. No L12242) — 5'-¹⁵⁷⁵CTC CCT AAT GGA AGC GGT GC¹⁵⁹⁴-3' (прямой), 5'-⁹⁶⁰GGT CAG TCT GAA CTT TGC GG⁹⁷⁹-3' (обратный).

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей. Филогенетический анализ с построением филогенетических деревьев про-

водили методом максимального правдоподобия на основе модели Тамуры–Неи [29] с использованием программного обеспечения MEGA7 [19].

Результаты

Проведено исследование фенотипической чувствительности и генетических детерминант резистентности к тетрациклину 399 клинических изолятов *N. gonorrhoeae*, собранных в различных регионах России в 2015–2017 гг. Анализ фенотипических характеристик современной российской популяции гонококковой инфек-

ции позволил выявить 75 штаммов, резистентных к тетрациклину (18,8%), 106 умеренно-резистентных изолята (26,6%) и 218 штаммов (54,6%), чувствительных к данному препарату. Используя метод гибридизации на биочипе было идентифицировано 193 штамма, обладающих различными детерминантами, ассоциированными с резистентностью к тетрациклину (табл. 1). Следует отметить, что у 10 штаммов с МПК тетрацилина ≥ 1 мг/л ни с помощью микрочипов, ни методом таргетного секвенирования не обнаружено известных мутаций, приводящих к резистентности, что требует их

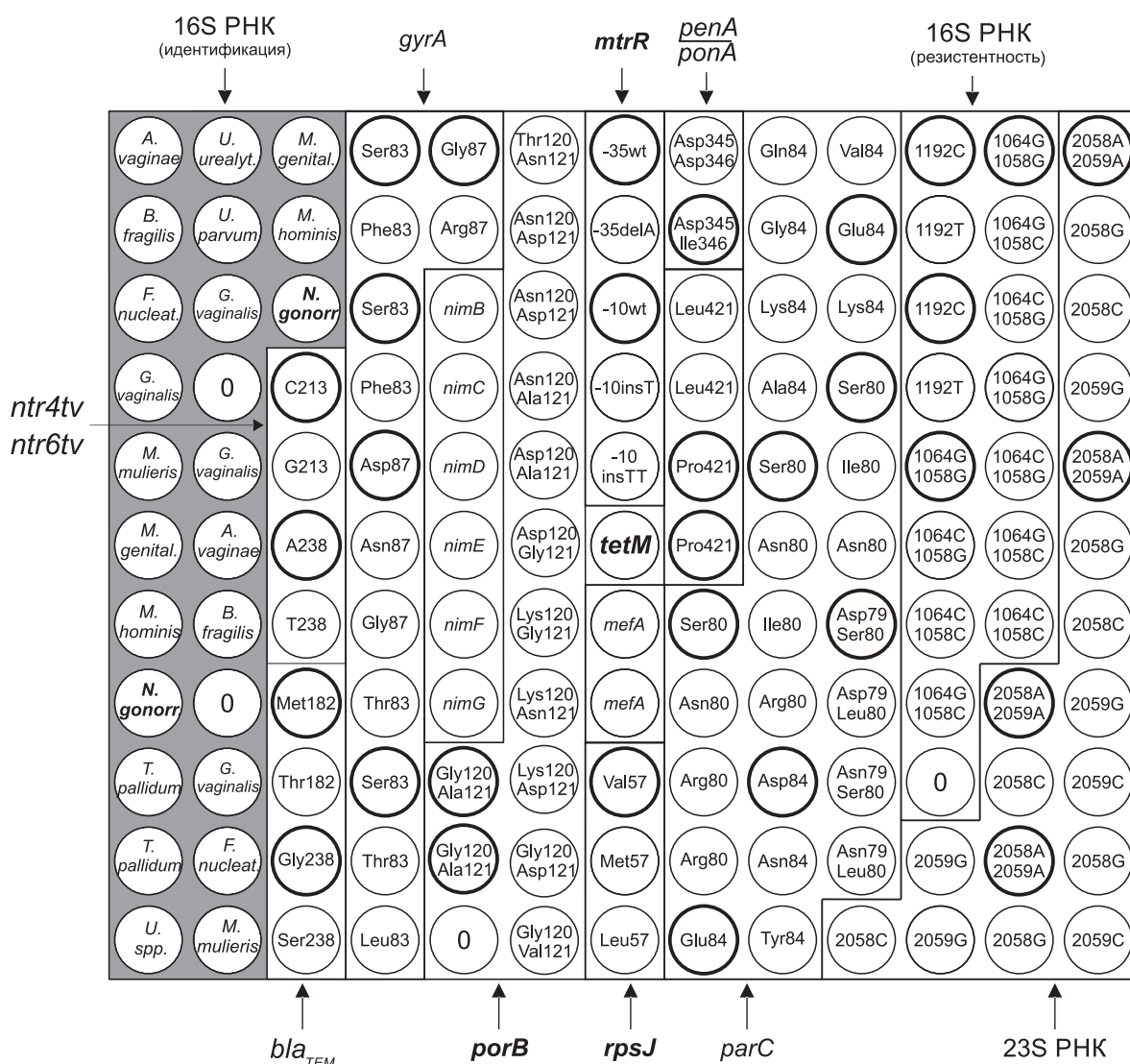


Рисунок 1. Схема расположения элементов на биочипе. Микрочип содержит видоспецифические зонды, выбранные из соответствующих последовательностей гена 16S рPHK для идентификации возбудителей инфекций репродуктивного тракта (выделено серым), включая *N. gonorrhoeae*, и зонды для анализа детерминант устойчивости к антимикробным препаратам. Элементы, содержащие олигонуклеотиды, соответствующие ДНК дикого типа, обведены черным контуром

Figure 1. Hybridization microarray configuration. Biochip contained species-specific oligonucleotide probes derived from 16S RNA gene sequences for identification of causative agents of reproductive tract infections (marked in grey), including *N. gonorrhoeae*, and oligonucleotide probes for analysis of resistance determinants. Biochip elements with oligonucleotides matching the wild-type sequence are marked with bold circles

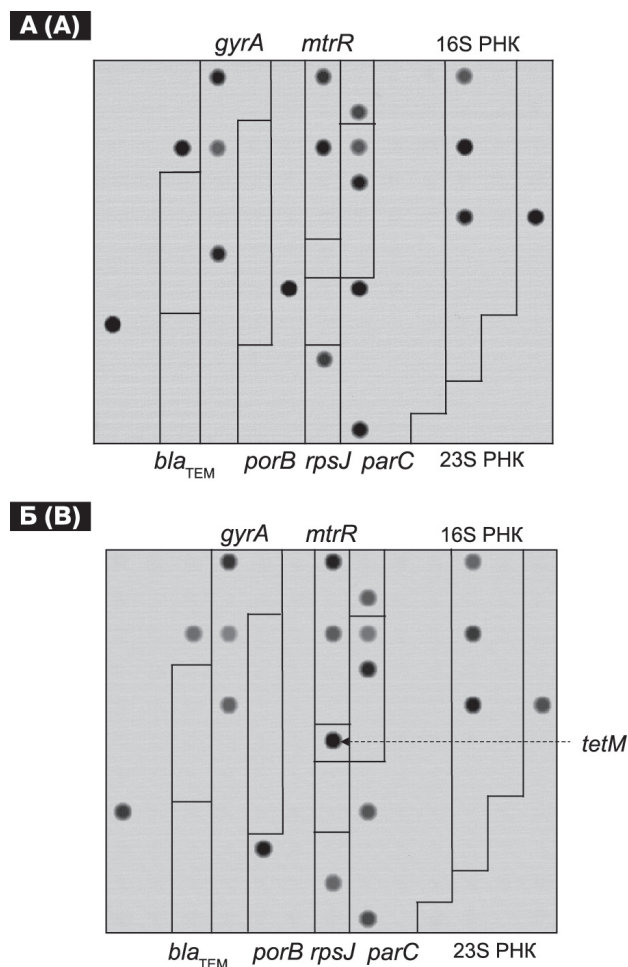


Рисунок 2. Флуоресцентные изображения микрочипов после проведения анализа образцов ДНК *N. gonorrhoeae*

Figure 2. Analysis of *N. gonorrhoeae* drug resistance markers by hybridization on a microarray (fluorescence image)

А. Результат анализа ДНК *N. gonorrhoeae*. Обнаружена мутация в гене поринового белка *porB* Gly120Lys, приводящая к устойчивости к антибиотикам пенициллинового ряда, тетрациклинам, макролидам, цефалоспорином. Дополнительно: обнаружена мутация в гене *gyrA* Asp87Asn (нумерация *E. coli*), приводящая к устойчивости к фторхинолонам. Б. Результат анализа ДНК *N. gonorrhoeae*. Обнаружена замена Val57Met в гене *rpsJ*, установлено наличие плазмидного гена *tetM*, ассоциированные с устойчивостью к тетрациклину. Дополнительно: обнаружена мутация в гене *parC* Ser80Asn (нумерация *E. coli*), приводящая к устойчивости к фторхинолонам.

A. The sample contained *N. gonorrhoeae* DNA. Hybridization analysis revealed the following mutations: Gly120Lys in the *porB* gene (resistance to penicillins, tetracyclines, macrolides, cephalosporins) and (additionally) Asp87Asn (numeration according to *E. coli*) in *gyrA* gene (resistance to fluoroquinolones). B. The sample contained *N. gonorrhoeae* DNA. Hybridization analysis revealed the presence of the plasmid *tetM* gene and the following mutations: Val57Met in the *rpsJ* gene (resistance to tetracyclines) and (additionally) Ser80Asn (numeration according to *E. coli*) in *gyrA* gene (resistance to fluoroquinolones).

углубленного исследования, в том числе с использованием технологии полногеномного секвенирования.

Фенотипически устойчивые к тетрациклину изоляты строго разделялись на 2 группы: штаммы, имеющие хромосомные мутации, для которых МПК тетрациклина не превышала 4 мг/л, и штаммы, несущие плазмиду с геном *tetM*, с высоким уровнем устойчивости (МПК ≥ 8 мг/л).

Анализ хромосомных детерминант резистентности к тетрациклину

В исследуемой выборке наиболее часто встречались мутации, приводящие к замене аминокислоты в кодоне 57 гена *rpsJ* хромосомной локализации (41,2%), в основном, замена Val57Met (табл. 2). Штаммы, несущие единичную замену Val57Met/Leu, являлись, как правило, умеренно резистентными (МПК 0,5–1 мг/л у 41 из 47 штаммов), 3 изолята были резистентны с МПК 2 мг/л. Мутации в гене *rpsJ* в совокупности с заменами в гене *porB* или делецией в промоторной области *mtrR* также приводили, в основном, к появлению умеренно резистентных штаммов (табл. 1).

Второй по частоте встречаемости оказались мутации в гене *porB*. Замена Gly120Lys, как правило, приводила к появлению резистентности к тетрациклину, как в случае единичной мутации, так и в совокупности с другими заменами. Например, пять штаммов с сочетанием мутаций Gly120Lys в гене *porB*, Val57Met/Leu в гене *rpsJ* обладали МПК 4 мг/л. Другие варианты замен в кодоне 120 (Gly на Asp, Asn или Thr), а также замены Ala121 на Asp, Asn и Gly оказывали значительное меньшее влияние на рост уровня устойчивости.

В исследуемой выборке также часто выявлялась мутация –35delA в промоторной области гена помпы эффлюкса *mtrR*, в то время как описанные в литературе инсерции тимидина Т или ТТ в положении –10 гена *mtrR* не были обнаружены. Одиночная мутация –35delA, наблюдаемая у пяти изолятов, приводила к появлению умеренной резистентности, в то время как эта замена в совокупности с заменами Val57Met/Leu в гене *rpsJ* и Gly120Lys в гене *porB* приводила к повышению МПК до 2–4 мг/л у 19 штаммов из 23.

Плазмидная детерминанта *tetM*

Плазмиды, несущие гены *tetM*, были обнаружены в 27 штаммах *N. gonorrhoeae*. Наличие гена *tetM* резко повышало МПК тетрациклина до очень высоких величин, в 10 штаммах наблюдали чрезвычайно высокий уровень МПК 32 и 64 мг/л. Таким образом, присутствие *tetM* приводило к значительно более высокой устой-

чивости *N. gonorrhoeae* к тетрациклину, чем наличие хромосомных детерминант. Штаммы с высоким уровнем резистентности в дополнение к *tetM* гену одновременно имели мутации в генах *rspJ* и *porB* (табл. 1).

Для всех обнаруженных генов *tetM* был определен тип гена: американский или голландский. Поскольку ДНК-чип содержал зонд для детекции *tetM*, общий для обоих типов гена, установление варианта проводили методом секвениро-

вания. Ген американского типа присутствовал в 17 штаммах, голландского — в 10 штаммах, причем наличие и тип плазмиды были ассоциированы с определенным регионом. Так, все 7 плазмидных генов, выделенных из образцов, собранных в Брянске, относились к голландскому типу, в то время как изоляты из Архангельска (4 штамма), Рязани (2 штамма), Калуги (2 штамма), Казани (2 штамма), Чувашии (Чебоксары) (5 штамма) обладали американским типом *tetM*.

Таблица 1. Соответствие между фенотипической чувствительностью штаммов *N. gonorrhoeae* к тетрациклину и генетическими детерминантами резистентности

Table 1. Correlation between phenotypic susceptibility for tetracycline in *N. gonorrhoeae* strains and genetic resistance determinants

Обнаруженные мутации (ген) Detected mutations (gene)	Количество изолятов с МПК, мг/л Number of strains with MIC, mg/L								
	Ч (МПК ≤ 0,25) S (MIC ≤ 0.25)	У/Р (МПК = 0,5–1) I (MIC = 0.5–1)	Р (МПК ≥ 2) R (MIC ≥ 2)						Всего устойчивых Total resistant
			2	4	8	16	32	64	
Val57Met/Leu (<i>rpsJ</i>)	3	41	3	–	–	–	–	–	3
Gly120Lys (<i>porB</i>)	1	1	3	1	–	–	–	–	4
Gly120Asp/Asn/Thr и (или) Ala121/Asp/Asn/Gly (<i>porB</i>)	2	2	1	–	–	–	–	–	1
Val57Met/Leu (<i>rpsJ</i>) Gly120Lys (<i>porB</i>)	2	–	1	5	–	–	–	–	6
Val57Met/Leu (<i>rpsJ</i>) Gly120Asp/Asn/Thr и (или) Ala121/Asp/Asn/Gly (<i>porB</i>)	2	21	4	–	–	–	–	–	4
–35delA (<i>mtrR</i>)	–	5	–	–	–	–	–	–	–
Gly120Lys (<i>porB</i>) –35delA (<i>mtrR</i>)	–	–	1	–	–	–	–	–	1
Val57Met/Leu (<i>rpsJ</i>) –35delA (<i>mtrR</i>)	9	13	6	1	–	–	–	–	7
Gly120Asp/Asn/Thr и (или) Ala121/Asp/Asn/Gly (<i>porB</i>) –35delA (<i>mtrR</i>)	1	1	–	–	–	–	–	–	–
Val57Met/Leu (<i>rpsJ</i>) Gly120Lys (<i>porB</i>) –35delA (<i>mtrR</i>)	1	3	14	5	–	–	–	–	19
Val57Met/Leu (<i>rpsJ</i>) Gly120Asp/Asn/Thr и (или) Ala121/Asp/Asn/Gly (<i>porB</i>) –35delA (<i>mtrR</i>)	1	9	2	1	–	–	–	–	3
Наличие гена <i>tetM</i> The presence of <i>tetM</i> gene	–	–	–	–	2	5	2	–	9
Наличие гена <i>tetM</i> The presence of <i>tetM</i> gene Val57Met/Leu (<i>rpsJ</i>)	–	–	–	–	–	8	3	–	11
Наличие гена <i>tetM</i> The presence of <i>tetM</i> gene Gly120Asp (<i>porB</i>)	–	–	–	–	–	–	1	–	1
Наличие гена <i>tetM</i> The presence of <i>tetM</i> gene Val57Met/Leu (<i>rpsJ</i>) Gly120Lys/Asp/Asn/Thr и (или) Ala121/Asp/Asn/Gly (<i>porB</i>)	–	–	–	–	–	2	2	2	6
Всего Total	22	96							75

Исключение составил Новосибирск, где было обнаружено три гена *tetM* голландского типа и один — американского. Значения МПК тетрациклина не зависели от типа плазмидного гена.

Используя сервис BLAST, выявлен ряд последовательностей у микроорганизмов из родов *Streptococcus*, *Enterococcus* и *Mycoplasma*, гомологичных генам *tetM N. gonorrhoeae*. Филогенетически близкие последовательности из других микроорганизмов были обнаружены как для генов американского (GenBank Acc. No. L12241, N. g. pOZ100 DNA American), так и голландского (GenBank Acc. No. L12242, N. g. pOZ101 DNA Dutch) аллелей (рис. 3). Полученные нами последовательности *tetM* генов в образцах, собранных в РФ, были депонированы в базу данных Genbank (на рис. 3 присвоенные номера приведены в скобках).

Диагностическая чувствительность и специфичность биологических микрочипов

С использованием результатов, полученных в данной работе, рассчитаны диагностическая чувствительность (S_n) и специфичность (S_p) биологических микрочипов при анализе резистентности клинических изолятов *N. gonorrhoeae* к тетрациклину в сравнении с референсным методом (фенотипическим анализом):

$$S_n = \frac{196}{196 + 22} \times 100\% = 89,9\%;$$

$$S_p = \frac{171}{171 + 10} \times 100\% = 94,5\%.$$

Полученные значения чувствительности и специфичности соответствуют диапазону, характеризующему лучшие зарубежные молекулярные тесты для идентификации генетических детерминант лекарственной устойчивости *N. gonorrhoeae* [11].

Обсуждение

Исследование выборки из 399 клинических изолятов *N. gonorrhoeae*, собранных в различных регионах РФ в 2015–2017 гг., показало, что в настоящее время доля штаммов, демонстрирующих резистентность к тетрациклину, включая штаммы с умеренной резистентностью, составила 45,4%. Как было показано в исследованиях по программе RU-GASP в 2008–2010 гг., доля резистентных к тетрациклину штаммов в РФ в эти годы превышала 75%. Также отмечалось, что уровень нечувствительных к тетрациклину штаммов в отдельных округах РФ варьировал от 64 до 100% [1, 6, 9]. Таким образом, более чем десятилетний отказ от использования тетрациклина для лечения гонококковой инфекции привел к заметному снижению доли резистентных штаммов. Похожая картина, то есть значительное уменьшение доли штаммов, нечувствительных к тетрациклину в 2009–2013 гг., была описана для Беларуси [21], Эстонии [14] и стран Южной Америки [10]. Тем не менее, число изолятов, фенотипически резистентных к тетрациклину и обладающих генетическими маркерами устойчивости, в настоящее время в РФ остается высокой. Принимая во внимание рекомендации ВОЗ, согласно которым антимикробный препарат не рекомендуется к применению, если доля резистентных к нему штаммов возбудителя $\geq 5\%$ [31], не следует ожидать скорого возвращения препаратов тетрациклинового ряда в арсенал средств для лечения гонококковой инфекции.

Причиной данной ситуации является сохранение в геноме возбудителя множественных генетических детерминант резистентности к тетрациклину, в настоящей работе проанализированных с использованием оригинального гидрогелевого биочипа. В исследуемой выборке обнаружены мутации в хромосомных генах

Таблица 2. Генетические детерминанты резистентности к тетрациклину в изолятах *N. gonorrhoeae*, собранных в РФ в 2015–2017 гг.

Table 2. Genetic determinants of tetracycline resistance in *N. gonorrhoeae* strains collected in the Russian Federation in 2015–2017

Ген Gene	Мутация Mutation	Количество изолятов (% от общего числа проанализированных штаммов) Number of isolates (% of total isolates analyzed)
<i>rpsJ</i>	Val57Met	155 (38,8%)
	Val57Leu	9 (2,3%)
	Всего в <i>rpsJ</i> /Total in <i>rpsJ</i>	164 (41,1%)
<i>porB</i>	Gly120Lys	41 (10,3%)
	Gly120Asp/Asn/Thr и/или Ala121Asp/Asn/Gly	51 (12,8%)
	Всего в <i>porB</i> /Total in <i>porB</i>	92 (23,1%)
<i>mtrR</i>	-35delA	73 (18,3%)
	-10insT, -10ins(TT)	0
<i>tetM</i>		27 (6,8%)

rpsJ (модификация мишени), *porB* (нарушение поступления антибиотика) и *mtrR* (усиление эффлюкса), при этом идентифицированы как одиночные замены, так и сочетания мутаций. Замена Val57Met/Leu в гене *rpsJ*, приводила к повышению МПК тетрациклина до умеренных величин. Наиболее важной мутацией в гене *porB* оказалась замена Gly120Lys, которая

оказывала более заметное влияние на резистентность к тетрациклину, чем другие замены в остатках 120–121. В целом, мутации в хромосомных генах приводили к увеличению МПК тетрациклина до 2–4 мг/л, что соответствует литературным данным [28, 30]. Полученные нами результаты подтверждают также известные данные о том, что мутации в пориновом

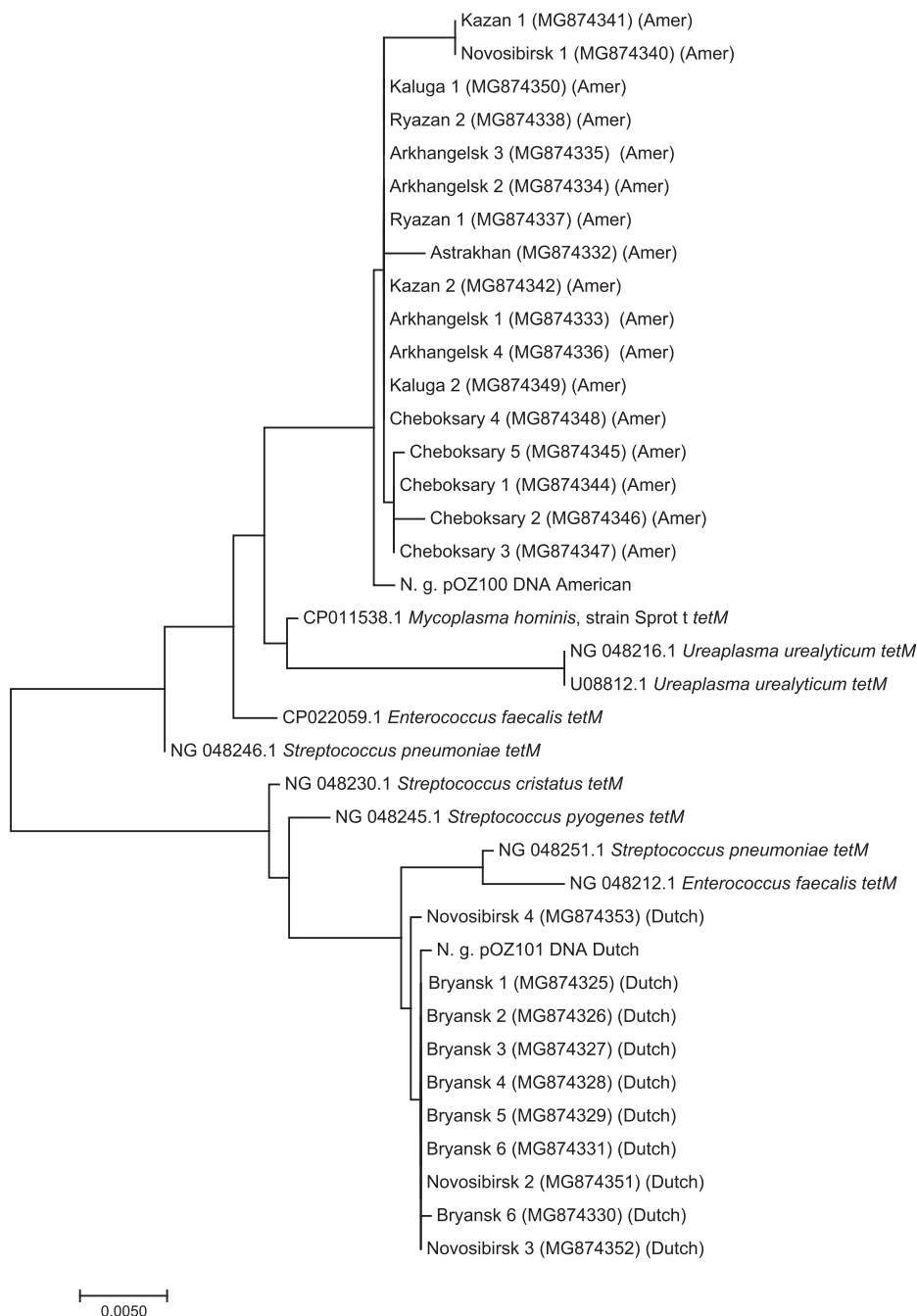


Рисунок 3. Филогенетическое дерево, построенное по локусам *tetM* из *N. gonorrhoeae* российской популяции и ряда филогенетически близких последовательностей. Для образцов *N. gonorrhoeae*, собранных в РФ, в скобках приведены номера депонированных в GenBank последовательностей и тип плазмидного гена (американский или голландский)

Figure 3. Evolutionary tree constructed for *tetM* loci in *N. gonorrhoeae* samples collected in Russia and a series of phylogenetically close sequences. For the samples collected in the Russian Federation accession numbers of sequences deposited to GenBank and plasmid gene type (American or Dutch) are given in brackets

белке и помпе эффлюкса действуют наиболее эффективно при их сочетании, когда нарушение поступления антимикробного препарата в клетку и одновременно усилен его эффлюкс [17]. Согласно нашим данным, для повышения уровня устойчивости до 4 мг/л необходимо было одновременное присутствие мутаций в генах *porB*, *rspJ* и *mtrR*.

Приобретение *N. gonorrhoeae* плазмидного гена *tetM* приводило к резкому повышению уровня устойчивости к тетрациклинам до величин МПК 8 мг/л и выше, который не достигался при наличии только хромосомных мутаций. Ген *tetM* был обнаружен в 27 штаммах, при этом оказалось, что в российской популяции присутствуют как американский, так и голландский тип гена, что подтверждает построенное филогенетическое дерево. Таким образом, результаты, полученные для изолятов, собранных в России, отличаются от результатов по распределению *tetM* гена в европейских странах, где преобладает американский тип гена [27], а также от результатов, полученных в Польше, в которой, в основном, обнаружен *tetM* ген голландского типа [23]. В то же время

филогенетическая близость нуклеотидных последовательностей *N. gonorrhoeae* внутри каждого из кластеров и отсутствие переходных форм между американскими и голландскими аллелями подтверждает происхождение *tetM* из разных источников.

Таким образом, биочип, представленный в данной работе, является полезным и удобным инструментом для быстрого массового скрининга детерминант резистентности возбудителя гонококковой инфекции, ассоциированных с устойчивостью к антимикробным препаратам. В случае расхождения полученных данных по генетическим маркерам резистентности с результатами культурального определения фенотипической чувствительности, клинические изоляты могут быть подвергнуты полногеномному анализу с использованием технологий секвенирования следующего поколения [15]. Микрочипы и тест-системы на их основе могут найти применение в медицинских учреждениях различного профиля для мониторинга антибиотикорезистентности, предупреждения распространения лекарственно-устойчивых форм и проведения адекватной терапии заболевания.

Список литературы/References

1. Боровская А.Д., Малахова М.В., Верещагин В.А., Ильина Е.Н., Говорун В.М., Припутневич Т.В., Аль-Хафаджи Н., Кубанова А.А. Анализ вклада молекулярных механизмов в формирование устойчивости гонококка к тетрациклину // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2007. Т. 144, прил. 2. С. 61–66. [Borovskaya A.D., Malakhova M.V., Vereshchagin V.A., Il'ina E.N., Govorun V.M., Priputnevich T.V., Al-Hafagi N., Kubanova A.A. Analysis of the contribution of molecular mechanisms into formation of gonococcal resistance to tetracycline. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2007, vol. 144, suppl. 2, pp. 432–437. doi: 10.1007/s10517-007-0347-9 (In Russ.)]
2. Гейдаров Р.Н., Фесенко Е.Е., Шаскольский Б.Л., Клотченко С.А., Васин А.В., Титов С.В., Дементьева Е.И., Михайлович В.М., Заседателев А.С., Киселев О.И. Определение генетических детерминант устойчивости вируса гриппа А к адамантанам и ингибиторам нейраминидазы на биологическом микрочипе // Доклады Академии наук. 2015. Т. 460, № 1. С. 102–106. [Heydarov R.N., Fesenko E.E., Shaskolskiy B.L., Klotchenko S.A., Vasin A.V., Titov S.V., Dementieva E.I., Zasedatelev A.S., Mikhailovich V.M., Kiselev O.I. Identification of genetic determinants of influenza A virus resistance to adamantanes and neuraminidase inhibitors using biological microarray. *Doklady Akademii nauk* = *Doklady Biochemistry and Biophysics*, 2015, vol. 460, no. 1, pp. 4–8. doi: 10.1134/S1607672915010032 (In Russ.)]
3. Грядунов Д.А., Шаскольский Б.Л., Наседкина Т.В., Рубина А.Ю., Заседателев А. С. Технология гидрогелевых биочипов ИМБ РАН: 30 лет спустя // Acta Naturae. 2018. Т. 10, № 4 (39). С. 30–44. [Gryadunov D.A., Shaskolskiy B.L., Nasedkina T.V., Rubina A.Yu., Zasedatelev A.S. The EIMB hydrogel microarray technology: thirty years later. *Acta Naturae*, 2018, vol. 10, no. 4 (39), pp. 4–18. (In Russ.)]
4. Кубанов А.А., Лейнсоо А.Т., Честков А.В., Дементьева Е.И., Шаскольский Б.Л., Соломка В.С., Грядунов Д.А., Дерябин Д.Г. Хромосомные детерминанты резистентности к антибиотикам и фенотипическая чувствительность к антимикробным препаратам *Neisseria gonorrhoeae* в российской популяции // Молекулярная биология. 2017. Т. 51, № 3. С. 431–444. [Kubanov A.A., Leinsoo A.T., Chestkov A.V., Dementieva E.I., Shaskolskiy B.L., Solomka V.S., Gryadunov D.A., Deryabin D.G. Drug resistance mutations and susceptibility phenotypes of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Russia. *Molekulyarnaya biologiya* = *Molecular Biology*, 2017, vol. 51, no. 3, pp. 379–388. doi: 10.7868/S0026898417030119 (In Russ.)]
5. Лейнсоо А.Т., Шаскольский Б.Л., Дементьева Е.И., Грядунов Д.А., Кубанов А.А., Честков А.В., Образцова О.А., Шпилевая М.В., Дерябин Д.Г. Олигонуклеотидный микрочип для идентификации возбудителей инфекций репродуктивного тракта с одновременным анализом детерминант резистентности к антимикробным препаратам // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2017. Т. 164, № 7. С. 63–72. [Leinsoo A.T., Shaskol'skii B.L., Dement'eva E.I., Gryadunov D.A., Kubanov A.A., Chestkov A.V., Obratsova O.A., Shpilevaya M.V., Deryabin D.G. Oligonucleotide microchip for the identification of infectious agents of reproductive system with simultaneous analysis of determinants of resistance to antimicrobial substances. *Byulleten' eksperimental'noy biologii i meditsiny* = *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 2017, vol. 164, no. 7, pp. 54–60. doi: 10.1007/s10517-017-3925-5 (In Russ.)]
6. Лесная И.Н., Соломка В.С., Фриго Н.В., Кубанов А.А., Полевщикова С.А., Сидоренко С.В. Выбор препаратов для лечения гонококковой инфекции на основании результатов мониторинга антибиотикорезистентности *N. gonorrhoeae* //

- Вестник дерматологии и венерологии. 2010. Т. 5. С. 65–73. [Lesnaya I.N., Solomka V.S., Frigo N.V., Kubanov A.A., Polevshchikova S.A., Sidorenko S.V. Selection of drugs for treatment of gonococcal infection based on the results of the monitoring of *N. gonorrhoeae* antibiotic resistance. *Vestnik Dermatologii i Venerologii*, 2010, vol. 5, pp. 65–73. (In Russ.)]
7. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания МУК 4.2.1890-04. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. 91 с. [Susceptibility testing of microorganisms to antibacterial agents: Guidelines 4.2.1890-04. Moscow: Federal Center of State Sanitary and Epidemiological Surveillance of the Russian Ministry of Health, 2004. 91 p. (In Russ.)]
 8. Приложение к приказу Минздрава России № 415 от 20.08.2003 «Протокол ведения больных “Гонококковая инфекция”». [Addendum to the Instruction of the Ministry of Health of the Russian Federation No. 415 from 20.08.2003 “Patient management protocol, gonococcal infection” (In Russ.)]
 9. Резистентность возбудителей ИППП к антибактериальным препаратам. Информационный бюллетень, 2008 год. М.: ООО «ДЭКС-ПРЕСС», 2008. 40 с. [Resistance of agents causing sexually transmitted infections to antibacterial preparations. Information bulletin, 2008. Moscow: DAKS-PRESS, 2008. 40 p. (In Russ.)]
 10. Dillon J.A., Trecker M.A., Thakur S.D. Two decades of the gonococcal antimicrobial surveillance program in South America and the Caribbean: challenges and opportunities. *Sex. Trans. Infect.*, 2013, vol. 89, suppl. 4, iv36–iv41. doi: 10.1136/sextrans-2012-050905
 11. Donà V., Smid J.H., Kasraian S., Egli-Gany D., Dost F., Imeri F., Unemo M., Low N., Endimiani A.J. Mismatch amplification mutation assay-based real-time PCR for rapid detection of *Neisseria gonorrhoeae* and antimicrobial resistance determinants in clinical specimens. *Clin. Microbiol.*, 2018, vol. 56, no. 9: e00365-18. doi: 10.1128/JCM.00365-18.
 12. Gascoyne D.M., Heritage J., Hawkey P.M., Turner A., van Klingeren B. Molecular evolution of tetracycline-resistance plasmids carrying TetM found in *Neisseria gonorrhoeae* from different countries. *J. Antimicrob. Chemother.*, 1991, vol. 28, no. 2, pp. 173–183. doi: 10.1093/jac/28.2.173
 13. Global priority list of antibiotic-resistant bacteria to guide research, discovery, and development of new antibiotics, February, 27, 2017. Geneva, Switzerland: WHO Press, 2017. 7 p.
 14. Golparian D., Brilene T., Laaring Y., Viktorova E., Johansson E., Domeika M., Unemo M. First antimicrobial resistance data and genetic characteristics of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Estonia, 2009–2013. *New Microbes New Infect.*, 2014, vol. 2, no. 5, pp. 150–153. doi: 10.1002/nmi2.57
 15. Golparian D., Donà V., Sánchez-Busó L., Foerster S., Harris S., Endimiani A., Low N., Unemo M. Antimicrobial resistance prediction and phylogenetic analysis of *Neisseria gonorrhoeae* isolates using the Oxford Nanopore MinION sequencer. *Sci. Rep.*, 2018, vol. 8, no. 1: 17596. doi: 10.1038/s41598-018-35750-4
 16. Gryadunov D., Nicot F., Dubois M., Mikhailovich V., Zasedatelev A., Izopet J. Hepatitis C virus genotyping using an oligonucleotide microarray based on the NS5B sequence. *J. Clin. Microbiol.*, 2010, vol. 48, no. 11, pp. 3910–3917. doi: 10.1128/JCM.01265-10
 17. Hu M., Nandi S., Davies C., Nicholas R.A. High-level chromosomally mediated tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* results from a point mutation in the rpsJ gene encoding ribosomal protein s10 in combination with the mtrR and penB resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 2005, vol. 49, no. 10, pp. 4327–4334. doi: 10.1128/AAC.49.10.4327-4334.2005
 18. Kubanov A., Vorobyev D., Chestkov A., Leinsoo A., Shaskolskiy B., Dementieva E., Solomka V., Plakhova X., Gryadunov D., Deryabin D. Molecular epidemiology of drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae* in Russia (Current Status, 2015). *BMC Infect. Dis.*, 2016, vol. 16, pp. 389. doi: 10.1186/s12879-016-1688-7
 19. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Biol. Evol.*, 2016, vol. 33, no. 7, pp. 1870–1874. doi: 10.1093/molbev/msw054
 20. Lagacé-Wiens P.R.S., Adam H.J., Laing N.M., Baxter M.R., Martin I., Mulvey M.R., Karlowsky J.A., Hoban D.J., Zhanel G.G. Antimicrobial susceptibility of clinical isolates of *Neisseria gonorrhoeae* to alternative antimicrobials with therapeutic potential. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2017, vol. 72, no. 8, pp. 2273–2277. doi: 10.1093/jac/dkx147
 21. Lebedzeu F., Golparian D., Titov L., Pankratava N., Glazkova S., Shimanskaya I., Charniakova N., Lukyanau A., Domeika M., Unemo M. Antimicrobial susceptibility/resistance and NG-MAST characterisation of *Neisseria gonorrhoeae* in Belarus, Eastern Europe, 2010–2013. *BMC Infect. Dis.*, 2015, vol. 15, no. 1, p. 29. doi: 10.1186/s12879-015-0755-9
 22. Marzancola M.G., Sedighi A., Li P.C. DNA microarray-based diagnostics. *Methods Mol. Biol.*, 2016, vol. 1368, pp. 161–178. doi: 10.1007/978-1-4939-3136-1_12
 23. Młynarczyk-Bonikowska B., Kujawa M., Malejczyk M., Młynarczyk G., Majewski S. Plasmid-mediated resistance to tetracyclines among *Neisseria gonorrhoeae* strains isolated in Poland between 2012 and 2013. *Postepy Dermatol. Alergol.*, 2016, vol. 33, no. 6, pp. 475–479. doi: 10.5114/ada.2016.63887
 24. Morse S.A., Johnson S.R., Biddle J.W., Roberts M.C. High-level tetracycline resistance in *Neisseria gonorrhoeae* is result of acquisition of streptococcal tetM determinant. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 1986, vol. 30, no. 5, pp. 664–670.
 25. Nguyen F., Starosta A.L., Arenz S., Sohmen D., Döhnhofer A., Wilson D.N. Tetracycline antibiotics and resistance mechanisms. *Biol. Chem.*, 2014, vol. 395, no. 5, pp. 559–575. doi: 10.1515/hsz-2013-0292
 26. Nosova E., Zimenkov D., Khakhalina A., Krylova L., Makarova M., Galkina K., Krasnova M., Isakova A., Safonova S., Litvinov V., Gryadunov D., Bogorodskaya E. A comparison of the Sensititre MycoTB Plate, the Bactec MGIT 960, and a microarray-based molecular assay for the detection of drug resistance in clinical isolates of *Mycobacterium tuberculosis* in Moscow, Russia. *PLoS One*, 2016, vol. 11: e0167093. doi: 10.1371/journal.pone.0167093
 27. Pachulec E., van der Does C. Conjugative plasmids of *Neisseria gonorrhoeae*. *PLoS One*, 2010, vol. 5, no. 4: e9962. doi: 10.1371/journal.pone.0009962
 28. Suay-García B., Pérez-García M.T. Drug-resistant *Neisseria gonorrhoeae*: latest developments. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, 2017, vol. 36, no. 7, pp. 1065–1071. doi: 10.1007/s10096-017-2931-x
 29. Tamura K., Nei M. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. *Mol. Biol. Evol.*, 1993, vol. 10, no. 3, pp. 512–526. doi: 10.1093/oxfordjournals.molbev.a040023

30. Unemo M., Shafer W.M. Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future. *Clin. Microbiol. Rev.*, 2014, vol. 27, no. 3, pp. 587–613. doi: 10.1128/CMR.00010-14
31. WHO. Global action plan to control the spread and impact of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. Geneva: WHO Press, 2012. 40 p.
32. Zimenkov D.V., Kulagina E.V., Antonova O.V., Krasnova M.A., Chernyaeva E.N., Zhuravlev V.Y., Kuz'min A.V., Popov S.A., Zasedatelev A.S., Gryadunov D.A. Evaluation of a low-density hydrogel microarray technique for Mycobacterial species identification. *J. Clin. Microbiol.*, 2015, vol. 53, no. 4, pp. 1103–1114. doi: 10.1128/JCM.02579-14
33. Zimenkov D.V., Kulagina E.V., Antonova O.V., Zhuravlev V.Y., Gryadunov D.A. Simultaneous drug resistance detection and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* using a low-density hydrogel microarray. *J. Antimicrob. Chemother.*, 2016, vol. 71, no. 6, pp. 1520–1531. doi: 10.1093/jac/dkw015

Авторы:

Дементьева Е.И., к.х.н., научный сотрудник лаборатории технологий молекулярной диагностики Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия;

Шаскольский Б.Л., к.х.н., научный сотрудник лаборатории технологий молекулярной диагностики Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия;

Лейнсоо А.Т., младший научный сотрудник лаборатории технологий молекулярной диагностики Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия;

Грядун Д.А., к.б.н., зав. лабораторией технологий молекулярной диагностики, зам. директора по научной работе Института молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, Россия;

Петрова Н.П., младший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и дерматозов ФГБУ Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии МЗ РФ, Москва, Россия;

Честков А.В., к.б.н., старший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и дерматозов ФГБУ Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии МЗ РФ, Москва, Россия;

Кубанов А.А., член-корреспондент РАН, д.м.н., профессор, главный научный сотрудник ФГБУ Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии МЗ РФ, Москва, Россия;

Дерябин Д.Г., д.м.н., профессор, зав. отделом лабораторной диагностики ИППП и дерматозов ФГБУ Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии МЗ РФ, Москва, Россия.

Authors:

Dementieva E.I., PhD (Chemistry), Researcher, Laboratory of Molecular Diagnostics Technologies, Engelhardt Institute of Molecular Biology of the Russian Academy of Sciences (RAS), Moscow, Russian Federation;

Shaskolskiy B.L., PhD (Chemistry), Researcher, Laboratory of Molecular Diagnostics Technologies, Engelhardt Institute of Molecular Biology of the RAS, Moscow, Russian Federation;

Leinsoo A.T., Junior Researcher, Laboratory of Molecular Diagnostics Technologies, Engelhardt Institute of Molecular Biology of the RAS, Moscow, Russian Federation;

Gryadunov D.A., PhD (Biology), Head of the Laboratory of Molecular Diagnostics Technologies, Deputy Director for Science of the Engelhardt Institute of Molecular Biology of the RAS, Moscow, Russian Federation;

Petrova N.P., Junior Researcher, Department of Laboratory Diagnostics of STD and Dermatoses, State Research Center of Dermatovenerology and Cosmetology of the Russian Ministry of Health, Moscow, Russian Federation;

Chestkov A.V., PhD (Biology), Senior Researcher, Department of Laboratory Diagnostics of STD and Dermatoses, State Research Center of Dermatovenerology and Cosmetology of the Russian Ministry of Health, Moscow, Russian Federation;

Kubanov A.A., RAS Corresponding Member, PhD (Medicine), Professor, Chief Researcher, State Research Center of Dermatovenerology and Cosmetology of the Russian Ministry of Health, Moscow, Russian Federation;

Deryabin D.G., PhD, MD (Medicine), Professor, Head of the Department of Laboratory Diagnostics of STD and Dermatoses, State Research Center of Dermatovenerology and Cosmetology of the Russian Ministry of Health, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 26.03.2018
Отправлена на доработку 04.03.2019
Принята к печати 22.03.2019

Received 26.03.2018
Revision received 04.03.2019
Accepted 22.03.2019