

**ХРОМОСОМНЫЕ ДЕТЕРМИНАНТЫ РЕЗИСТЕНТНОСТИ
К АНТИБИОТИКАМ И ФЕНОТИПИЧЕСКАЯ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬ
К АНТИМИКРОБНЫМ ПРЕПАРАТАМ В РОССИЙСКОЙ ПОПУЛЯЦИИ
*Neisseria gonorrhoeae***

© 2017 г. А. А. Кубанов^а, А. Т. Лейнсоо^б, А. В. Честков^а, Е. И. Дементьева^б,
Б. Л. Шаскольский^б, В. С. Соломка^а, Д. А. Грядунов^б, Д. Г. Дерябин^{а, *}

^аГосударственный научный центр дерматовенерологии и косметологии Минздрава России, Москва, 107076 Россия

^бИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 199991 Россия

*e-mail: dgderyabin@yandex.ru

Поступила в редакцию 30.03.2016 г.

Принята к печати 14.06.2016 г.

Прогрессирующая устойчивость *Neisseria gonorrhoeae* к антимикробным препаратам делает актуальным мониторинг распространения генетических детерминант антибиотикорезистентности. В настоящей работе проведено сопоставление генетических детерминант резистентности, паттернов фенотипической чувствительности и генотипов 128 изолятов *N. gonorrhoeae*, полученных в 2015 году в 9 субъектах РФ. Идентификацию мутаций в хромосомных генах *penA*, *ponA*, *rpsJ*, *gyrA*, *parC*, определяющих устойчивость *N. gonorrhoeae* к пенициллинам, тетрациклинам и фторхинолонам, проводили посредством мультиплексной амплификации с последующей гибридизацией на гидрогелевом ДНК-чипе. В современной российской популяции *N. gonorrhoeae* наибольшей частотой распространения характеризовалась инсерция аспартата в 345-м кодоне гена *penA* (76.6%), в то время как мутации Leu421Pro в гене *ponA*, Val57Met (*rpsJ*), Ser91Phe (*gyrA*), Asp95Gly (*gyrA*) и Ser87Arg (*parC*) выявлялись в 32.8–36.7%. Для трети исследованных штаммов *N. gonorrhoeae* характерно одновременное присутствие в бактериальной хромосоме множественных детерминант резистентности, в результате чего мутационные профили и паттерны устойчивости к антибактериальным препаратам приобретали отличное от нормального бимодальное статистическое распределение. Условием для распространения данного механизма резистентности представляется вертикальный характер наследования соответствующих хромосомных мутаций, а его следствием – накопление в популяции *N. gonorrhoeae* генетически связанных штаммов (клонов) с признаками множественной устойчивости к антимикробным препаратам.

Ключевые слова: *Neisseria gonorrhoeae*, генетические детерминанты резистентности, фенотипическая чувствительность, ДНК-чип, статистический анализ, мультирезистентность

DOI: 10.7868/S0026898417030119

ВВЕДЕНИЕ

Возникновение и быстрое распространение устойчивости микроорганизмов к вводимым в клиническую практику антибиотикам является одной из глобальных проблем медицины [1]. В докладах ВОЗ [2, 3] отмечается опасность развития тотальной устойчивости к антибактериальным препаратам для целого ряда возбудителей инфекционных заболеваний. Особую озабоченность вызывают микроорганизмы вида *Neisseria gonorrhoeae*, прогрессирующая резистентность которых создает перспективу превращения гонореи в разряд потенциально неизлечимых инфекций [4].

Известные пути формирования антибиотикорезистентности связаны с двумя основными механизмами: 1) приобретением новых генов, часто подверженных горизонтальному переносу в составе мобильных элементов (плазмид и транспозонов) и кодирующих ферменты, разрушающие молекулы антибиотиков; 2) изменениями в хромосомных генах, кодирующих “мишени” для их воздействия [5]. При этом анализ лекарственной устойчивости гонококков [6] свидетельствует о превалирующем значении второго механизма, связанного с изменениями их собственного генома. В частности, резистентность *N. gonorrhoeae* к пенициллинам, обусловленная наличием TEM-1-по-

Сокращения: МИК – минимальная ингибирующая концентрация.

добной β -лактамазы, не получила широкого распространения, в то время как мутации в хромосомных генах *ponA* (замена аминокислоты Leu на Pro в положении 421) [7] и *penA* (инсерция трех нуклеотидов с появлением аминокислоты Asp в положении 345) [8] привели к существенному снижению аффинности кодируемых ими пенициллин-связывающих белков с утратой терапевтической эффективности пенициллина при лечении гонококковой инфекции к 70-м годам XX века. Сформировавшаяся тогда же устойчивость *N. gonorrhoeae* к тетрациклинам связана с точечной мутацией в гене *rpsJ*, кодирующем рибосомальный белок S10 [9], усиливаемой сочетанием с мутациями в генах *mtrR* (репрессор транскрипции *mtrCDE* оперона, ответственный за регуляцию экспрессии помпы эффлюкса MtrC–MtrD–MtrE, выводящей антибиотик из периплазматического пространства гонококков) и *penB* (пориновый белок, обеспечивающий транспорт антибиотика через наружную мембрану) [10]. Фторхинолоны, применяемые для лечения гонококковой инфекции с конца 80-х годов XX века, также недолго сохраняли свою эффективность: уже через 10 лет начали появляться сообщения о неудачах их использования [11], что привело к исключению данной группы антибиотиков из схем эмпирической терапии в США и странах Западной Европы [12], а с 2010 года и в Российской Федерации [13]. Формирование устойчивости вновь оказалось связано с накоплением мутаций в геноме *N. gonorrhoeae*, на этот раз затрагивающих систему репликации ДНК: гены *gyrA* (кодирует А-субъединицу ДНК-гиразы) [14] и *parC* (кодирует А-субъединицу ДНК-топиомеразы) [15].

В результате к настоящему моменту в арсенале антибиотикотерапии гонококковой инфекции остались только аминоциклитол спектиномицин и цефалоспорины III-го поколения (цефтриаксон и цефиксим), однако устойчивость к последним также развивается быстрыми темпами путем накопления мутаций в хромосомных генах *penA*, *penB*, *ponA*, *mtrR* и *porB* [16].

Таким образом, изучение молекулярно-генетических механизмов устойчивости *N. gonorrhoeae* к антимикробным препаратам для своевременного предупреждения распространения резистентных форм гонококковой инфекции является актуальной задачей. Одно из направлений исследований – анализ характера распространения хромосомных генетических детерминант антибиотикорезистентности (мутационного профиля) в популяции *N. gonorrhoeae*.

Цель данной работы – идентификация мутационного профиля в генах *penA*, *ponA*, *rpsJ*, *gyrA* и *parC* у изолятов *Neisseria gonorrhoeae*, выделенных на территории Российской Федерации в 2015 году, с определением соответствий полученных данных

паттернам фенотипической чувствительности возбудителя гонококковой инфекции к антимикробным препаратам.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Реагенты и ферменты. В работе использовали наборы для выделения ДНК “ДНК-Экспресс” (“Литех”, Россия); воду, не содержащую нуклеаз (“Sigma”, США); раствор dNTP, ПЦР-буфер, фермент Taq-ДНК-полимераза (все – “СибЭнзим”, Россия); флуоресцентный субстрат “IMD515-dUTP” (ИМБ РАН, Россия).

Штаммы *N. gonorrhoeae*. В исследование включены 128 изолятов *N. gonorrhoeae*, полученных в 2015 г. из специализированных учреждений дерматовенерологического профиля 9 субъектов Российской Федерации. Первоначальный посев поступивших культур проводили на шоколадный агар с добавлением 1% ростовой добавки ISOVitalex и 1%-ной селективной добавки VCAT (Becton Dickinson, США), после чего колонии микроскопировали и исследовали с использованием оксидазного теста. Окончательная верификация грамотрицательных оксидазоположительных диплококков проводилась по совокупности биохимических активностей с использованием карт идентификации NH на анализаторе VITEK 2 Compact (“bioMérieux”, Франция).

Определение фенотипической чувствительности *N. gonorrhoeae* к антимикробным препаратам. Чувствительность гонококков к шести антибиотикам (пенициллин, цефтриаксон, тетрациклин, азитромицин, спектиномицин, цiproфлоксацин) исследовали методом серийных разведений, используя в качестве основы шоколадный агар с добавлением 1%-ной ростовой добавки ISOVitalex (“Becton Dickinson”, США). Результаты чувствительности выражали значениями минимальных ингибирующих концентраций (МИК, мг/л). Итоговая оценка чувствительности проводилась в соответствии с критериями CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institution – Институт клинических и лабораторных стандартов, США) [17], к азитромицину – в соответствии с критериями EUCAST (European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing – Европейский комитет по определению чувствительности к антибиотикам) [18]. Согласно данным критериям исследуемые штаммы *N. gonorrhoeae* относили к категории чувствительных (S – susceptible), умеренно чувствительных (I – intermediate) и резистентных (R – resistant).

Идентификация мутаций в геноме *N. gonorrhoeae*, ассоциированных с лекарственной устойчивостью, с использованием гидрогелевого ДНК-чипа. Идентификацию мутаций в хромосомных генах *penA*, *ponA*, *rpsJ*, *gyrA*, *parC*, кодирующих мишени для пенициллина, тетрациклина и фторхинолонов,

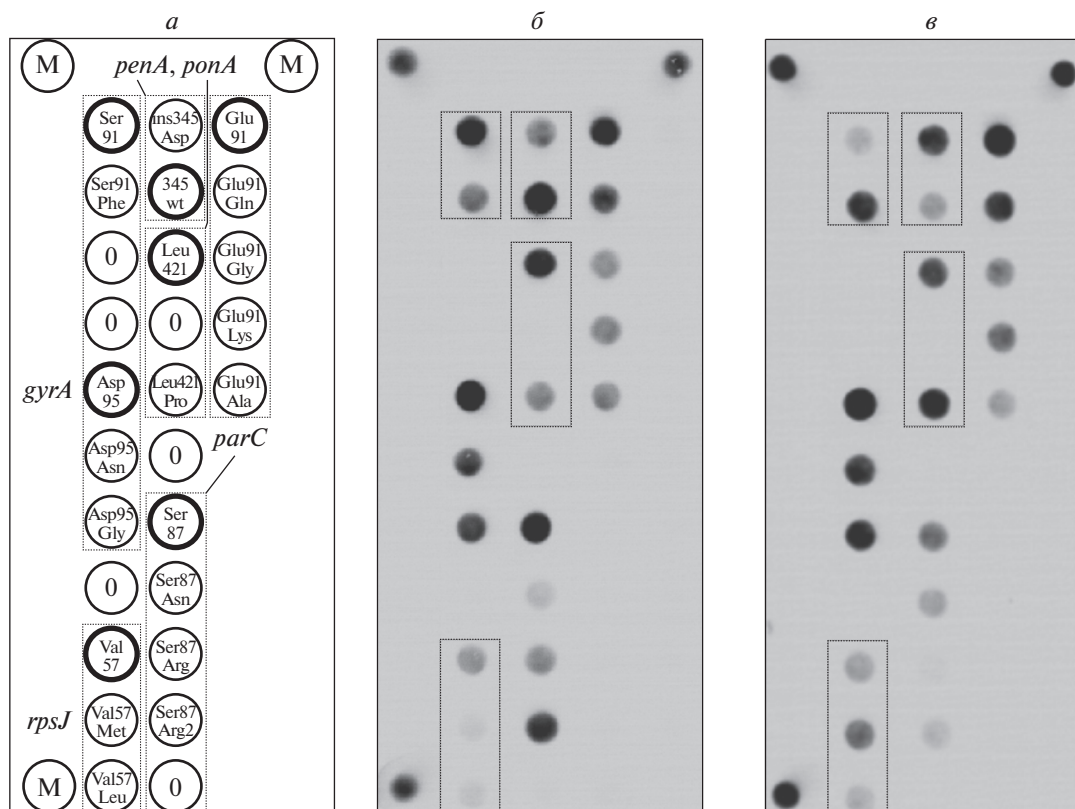


Рис. 1. Использование ДНК-чипа для идентификации мутаций в хромосомных генах *N. gonorrhoeae*, кодирующих “мишени” для антибиотиков: *а* – Схема ДНК-чипа. Кластеры элементов, соответствующие различным анализируемым генам, обведены тонким контуром. Обозначения ячеек даны в соответствии с названиями олигонуклеотидов в табл. 1. *б* – Результат анализа ДНК штамма дикого типа. *в* – Результат анализа образца ДНК *N. gonorrhoeae* с мутациями: инсерция Asp345 в гене *penA*, Leu421Pro в гене *ponA*, Val57Met в гене *rpsJ*, Ser91Phe в гене *gyrA*.

проводили посредством мультиплексной амплификации фрагментов вышеупомянутых генов с последующей гибридизацией на гидрогелевом ДНК-чипе, содержащем иммобилизованные олигонуклеотиды.

Конструирование нуклеотидных последовательностей олигонуклеотидов для иммобилизации на ДНК-чипе и праймеров для амплификации, их синтез и очистку проводили согласно опубликованным ранее процедурам [19].

ДНК-чип содержал 21 гелевый элемент с иммобилизованными олигонуклеотидами, шесть ячеек с индексом “О” без зондов и три ячейки с индексом “М” с ковалентно связанным флуоресцентным красителем, используемым для автоматического вычисления интенсивности флуоресценции ячеек микрочипа после гибридизации (рис. 1а). Обозначение ячеек, содержащих иммобилизованные олигонуклеотиды, и назначение зондов приведено в табл. 1. ДНК-чипы были изготовлены по ранее описанной методике [20] и укомплектованы гибридизационной камерой объемом 30 мкл (“БИОЧИП-ИМБ”, Россия).

Исследуемые фрагменты генов *N. gonorrhoeae* амплифицировали, используя метод мультиплексной ПЦР, принципиальная схема которой была описана ранее [21]. Реакционная смесь (30 мкл) включала 3 мкл ПЦР-буфера, 3 мкл Taq-ДНК-полимеразы, 200 мкМ смесь dNTP, 10 нМ каждого из прямых праймеров и 100 нМ каждого из обратных праймеров (таблица S1, см. Приложение на сайте http://www.molecbio.com/downloads/2017/3/supp_Кубанов_gus.pdf), 8 мкМ флуоресцентного субстрата и 3 мкл образца выделенной ДНК. Использовали следующую последовательность стадий ПЦР: денатурация при 95°C, 50 циклов по схеме 95°C – 30 с, 64°C – 30 с, 72°C – 30 с и 72°C – 5 мин.

Процедуру гибридизации амплифицированных фрагментов на ДНК-чипе и обработку результатов гибридизации проводили, как описано ранее [22], сравнивая интенсивность сигналов флуоресценции элементов, содержащих олигонуклеотиды, соответствующие дикому типу и мутантным вариантам (рис. 1б, в). Если максимальный сигнал регистрировали в элементе, соответствующем ДНК дикого типа, то это означало, что

в данной аминокислотной позиции изучаемый образец ДНК мутаций не имел. Если регистрировали максимальный сигнал в ячейке, соответствующей ДНК с мутацией, это означало, что по данной аминокислотной позиции изучаемый образец ДНК обладал мутацией.

Молекулярное типирование *N. gonorrhoeae*. NG-MAST генотипирование (*Neisseria gonorrhoeae* Multi Antigen Sequence Typing) [23] анализируемых изолятов проводили путем секвенирования нуклеотидных последовательностей фрагментов двух вариабельных генов: *porB* (кодирует белок поринового канала) и *tbpB* (кодирует бета-субъединицу трансферрин-связывающего белка). По результатам секвенирования каждой из данных аллелей и их последующего сравнения с международной базой данных www.ng-mast.net делали заключение о принадлежности изолята к определенному молекулярному типу (“сиквенс-типу”) *N. gonorrhoeae*, имеющему оригинальное цифровое обозначение, например NG-MAST 807.

Статистическая обработка результатов исследования. Взаимосвязи между генотипическими и фенотипическими характеристиками *N. gonorrhoeae* оценивали в программе Statistica 10 (StatSoft, США) с использованием модулей “кластер-

ный анализ” и “факторный анализ”. Анализ влияния мутаций на чувствительность *N. gonorrhoeae* к пенициллину и цефтриаксону проводили с использованием непараметрического критерия Вилкоксона–Манна–Уитни. При последующем анализе учитывали значения с достоверностью $P < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Идентификация мутаций в генах, кодирующих мишени для антибиотиков, и их распространение в популяции N. gonorrhoeae

Наиболее часто представленной мутацией в анализируемой выборке *N. gonorrhoeae* (у 98 из 128 исследованных штаммов – 76.6%) являлась инсерция аспарагиновой кислоты в кодоне 345 гена *penA*. Другая мутация, также детерминирующая формирование устойчивости к β-лактамам антибиотикам (замена Leu421Pro в гене *ponA*), встречалась в два раза реже: у 47 из 128 исследованных штаммов – 36.7%.

Мутации, затрагивающие ген *rpsJ*, преимущественно были связаны с аминокислотной заменой Val57Met (46 штаммов – 35.9%), в то время как замена Val57Leu выявлялась только у 6 штаммов (4.7%). Сходная частота мутаций была харак-

Таблица 1. Олигонуклеотиды, иммобилизованные на ДНК-чипе, для идентификации мутаций, ассоциированных с резистентностью к пенициллину, тетрациклину и фторхинолонам

Обозначение	Ген	Назначение олигонуклеотида
345 wt	<i>penA</i>	С последовательностью дикого типа в кодоне 345
ins345Asp	<i>penA</i>	Инсерция аспартата в кодоне 345
Leu421	<i>ponA</i>	С последовательностью дикого типа в кодоне 421
Leu421Pro	<i>ponA</i>	Для определения замены лейцина на пролин в кодоне 421
Val57	<i>rpsJ</i>	С последовательностью дикого типа в кодоне 57
Val57Met	<i>rpsJ</i>	Для определения замены валина на метионин в кодоне 57
Val57Leu	<i>rpsJ</i>	Для определения замены валина на лейцин в кодоне 57
Ser91	<i>gyrA</i>	С последовательностью дикого типа в кодоне 91
Ser91Phe	<i>gyrA</i>	Для определения замены серина на фенилаланин в кодоне 91
Asp95	<i>gyrA</i>	С последовательностью дикого типа в кодоне 95
Asp95Asn	<i>gyrA</i>	Для определения замены аспартата на аспарагин в кодоне 91
Asp95Gly	<i>gyrA</i>	Для определения замены аспартата на глицин в кодоне 91
Ser87	<i>parC</i>	С последовательностью дикого типа в кодоне 87
Ser87Asn	<i>parC</i>	Для определения замены серина на аспарагин в кодоне 87
Ser87Arg ₁	<i>parC</i>	Для определения замены серина на аргинин в кодоне 87 (вариант 1)
Ser87Arg ₂	<i>parC</i>	Для определения замены серина на аргинин в кодоне 87 (вариант 2)
Glu91	<i>parC</i>	С последовательностью дикого типа в кодоне 91
Glu91Gln	<i>parC</i>	Для определения замены глутамата на глутамин в кодоне 91
Glu91Gly	<i>parC</i>	Для определения замены глутамата на глицин в кодоне 91
Glu91Lys	<i>parC</i>	Для определения замены глутамата на лизин в кодоне 91
Glu91Ala	<i>parC</i>	Для определения замены глутамата на аланин в кодоне 91

терна и для гена *gyrA*. Так, аминокислотная замена Ser91Phe была зафиксирована у 47 штаммов (36.7%), а Asp95Gly у 42 штаммов (32.8%), при этом в большинстве случаев эти мутации встречались совместно (у 40 штаммов, 31.3%). На этом фоне мутация, приводящая к аминокислотной замене Asp95Asn, обнаруживалась значительно реже (только у 2 штаммов — 1.6%), в обоих случаях будучи ассоциированной с аминокислотной заменой Ser91Phe. Наконец, в гене *parC* типично регистрировалась замена Ser87Arg (вариант 1) у 42 штаммов (32.8%). В свою очередь аминокислотная замена Glu91Gly присутствовала только у 2 штаммов (1.6%), а замены Ser87Arg (вариант 2), Glu91Gln, Glu91Lys и Glu91Ala не были обнаружены.

Таким образом, в анализируемой выборке *N. gonorrhoeae* наибольшее распространение получила мутация в гене *penA* (у 3 из каждых 4 изолятов), в то время как мутации в генах *ponA*, *rpsJ*, *gyrA* и *parC* имели сходную частоту распространения, обнаруживаясь примерно у трети (32.8–40.6%) исследованных штаммов. У 24 из 128 изолятов (18.8%) мутаций обнаружено не было, на основании чего они были отнесены к группе штаммов “дикого типа”.

Анализ частоты присутствия одной или нескольких мутаций у отдельных штаммов *N. gonorrhoeae* показал, что зафиксированное распределение является не нормальным, а бимодальным (рис. 2), обусловленным высокими частотами присутствия в анализируемой выборке изолятов с одиночными и множественными мутациями. Максимальную частоту распространения имели штаммы *N. gonorrhoeae* с одной точечной мутацией (типично — ins345Asp в гене *penA*): 48 изолятов — 37.5%. В свою очередь второй максимум распределения был связан со штаммами, несущими одновременно шесть мутаций (36 изолятов — 28.1%), наиболее типично ins345Asp (*penA*) + Leu421Pro (*ponA*) + Val57Met (*rpsJ*) + Ser91Phe и Asp95Gly (*gyrA*) + Ser87Arg (*parC*).

Сопоставление результатов генетического анализа и паттернов фенотипической чувствительности *N. gonorrhoeae* к антимикробным препаратам

Среди разнообразия возможных паттернов резистентности *N. gonorrhoeae* (табл. 2) доминировали четыре варианта, формирующие суммарно 89.1% от всей анализируемой выборки. Наиболее многочислен вариант, ассоциированный с чувствительностью ко всем использованным антибиотикам (47 штаммов) и характеризуемый мутационным профилем дикого типа (18 штаммов) либо наличием одиночной мутации ins345Asp в гене *penA*. Среди монорезистентных паттернов доминировали штаммы со сниженной чувствительностью к пенициллину (МИК ≥ 0.12 мг/л; 22 штамма), типично имеющие единственную

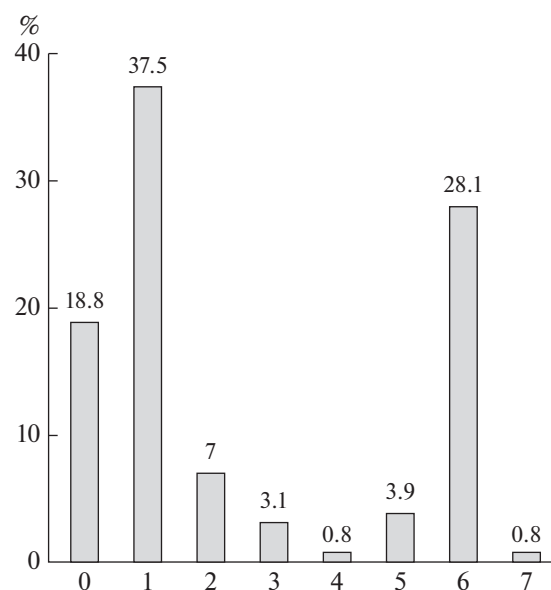


Рис. 2. Частота встречаемости штаммов *N. gonorrhoeae* с одиночными и множественными мутациями в генах, детерминирующих устойчивость к антибиотикам (%). По оси абсцисс: 0–7 соответствует количеству мутаций, обнаруживаемых у отдельных штаммов *N. gonorrhoeae*.

мутацию в гене *penA*. В свою очередь, наиболее многочисленные группы *N. gonorrhoeae* с отсутствием чувствительности к 2 или 3 антибиотикам были представлены паттернами “пенициллин + ципрофлоксацин” (22 штамма) и “пенициллин + тетрациклин + ципрофлоксацин” (23 штамма), характеризующимися наличием множественных мутаций в генах, кодирующих “мишени” для данных антибиотиков.

Отдельно следует отметить наличие единичных изолятов, отличающихся высоким уровнем фенотипической чувствительности при наличии множественных мутаций (1 штамм), либо устойчивостью к трем–четырем препаратам при мутационном профиле, соответствующем дикому типу (2 штамма). Подобный результат свидетельствует о существовании иных, неучтенных при выполнении настоящего исследования механизмов устойчивости *N. gonorrhoeae* к антибиотикам, одновременно позволяя объяснить большинство выявленных паттернов их фенотипической чувствительности именно мутационными профилями в генах, кодирующих мишени для антибиотиков.

Многомерный статистический анализ мутационных профилей и паттернов фенотипической чувствительности *N. gonorrhoeae*

Результаты проведенного множественного корреляционного анализа подтвердили взаимосвязь между большинством отдельных мутаций и детер-

минируемой ими устойчивостью *N. gonorrhoeae* к антимикробным препаратам.

Так резистентность к пенициллину менее выражено коррелировала с наличием мутации в генах *penA* ($r = 0.26$) и более значительно с мутацией в гене *ponA* ($r = 0.56$), что хорошо согласуется с представлениями о важности изменения кодируемых ими пенициллин-связывающих белков в развитии устойчивости к данному антибиотику [7, 8]. При этом анализ распределений МИК пенициллина свидетельствовал о статистически значимых ($P < 0.01$) различиях между штаммами дикого типа и *N. gonorrhoeae*, несущими мутацию *ins345Asp(penA)*, а одновременное присутствие двух мутаций *ins345Asp(penA) + Leu421Pro(ponA)* еще более смещало значения МИК в зону высоких значений (рис. 3).

Одновременно следует отметить, что воздействие данных мутаций на распределение МИК цефтриаксона также было сонаправленным (рис. 3), что свидетельствует в пользу значимости ряда ранее накопленных мутаций, кодирующих мишени для пенициллина, в современной эволюции *N. gonorrhoeae*, заключающейся в прогрессирующем снижении чувствительности к цефалоспорином III поколения [24].

Другая значимая группа коэффициентов корреляции была установлена между устойчивостью к ципрофлоксацину и детерминантами Ser91Phe(*gyrA*) ($r = 0.59$), Asp95Gly(*gyrA*) ($r = 0.55$) и Ser87Arg(*parC*) ($r = 0.51$), что соответствует данным о множественных мутациях в системе репликации ДНК как важном механизме устойчивости *N. gonorrhoeae* к фторхинолонам [13, 14].

С другой стороны, связь устойчивости к тетрациклину с наличием точечных мутаций Val57Met и Val57Leu в гене *rpsJ* характеризовалась статистически незначимыми коэффициентами корреляции, предположительно объясняемыми их относительной недостаточностью в отсутствие аддитивных мутаций в генах *mtrR* и *penB* [9]. В свою очередь, отсутствие статистически значимых коэффициентов корреляции между исследованными генетическими детерминантами и устойчивостью к спектиномицину и азитромицину может объясняться отсутствием в перечне исследуемых детерминант мутаций в генах 16S рРНК [25] и 23S рРНК [26, 27], определяющих формирование резистентности к данным антибиотикам через изменение тонкой структуры бактериальной рибосомы.

Следует также отметить высокие положительные значения коэффициентов корреляции (0.70–0.91), связывающие между собой мутации Leu421Pro (*ponA*), Val57Met/Leu (*rpsJ*), Ser91Phe

Таблица 2. Фенотипическая чувствительность к антибиотикам и ее соответствие мутационным профилям *N. gonorrhoeae*

Паттерны чувствительности*	Количество штаммов, ед. (%)	Мутационный профиль					
		<i>penA</i>	<i>ponA</i>	<i>rpsJ</i>	<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	Нет мутаций (дикий тип)
Чувствительны к 6 антибиотикам	47 (36.7)	25	2	2	1	1	18
Нечувствительны к 1 антибиотику:							
Пен	23 (18.0)	22	1	4	3	2	1
Тет	2 (1.6)	–	–	–	–	–	2
Спек	1 (0.8)	–	–	–	–	–	1
Ази	1 (0.8)	1	–	–	–	–	–
Цип	1 (0.8)	1	–	–	–	–	–
Нечувствительны к 2 антибиотикам:							
Пен + Тет	2 (1.6)	2	1	1	–	1	–
Пен + Цип	22 (17.2)	22	20	20	21	20	–
Спек + Ази	1 (0.8)	1	–	1	–	–	–
Нечувствительны к 3 антибиотикам:							
Пен + Тет + Цип	23 (18.0)	21	18	19	20	17	1
Пен + Цеф + Цип	1 (0.8)	1	–	–	–	–	–
Нечувствительны к 4 антибиотикам:							
Пен + Тет + Ази + Цип	4 (3.1)	3	3	2	2	2	1

* Чувствительными считались штаммы, оцененные как S (susceptible) по критериям CLSI и EUCAST; нечувствительными – штаммы, оцененные как I (intermediate) и R (resistant).

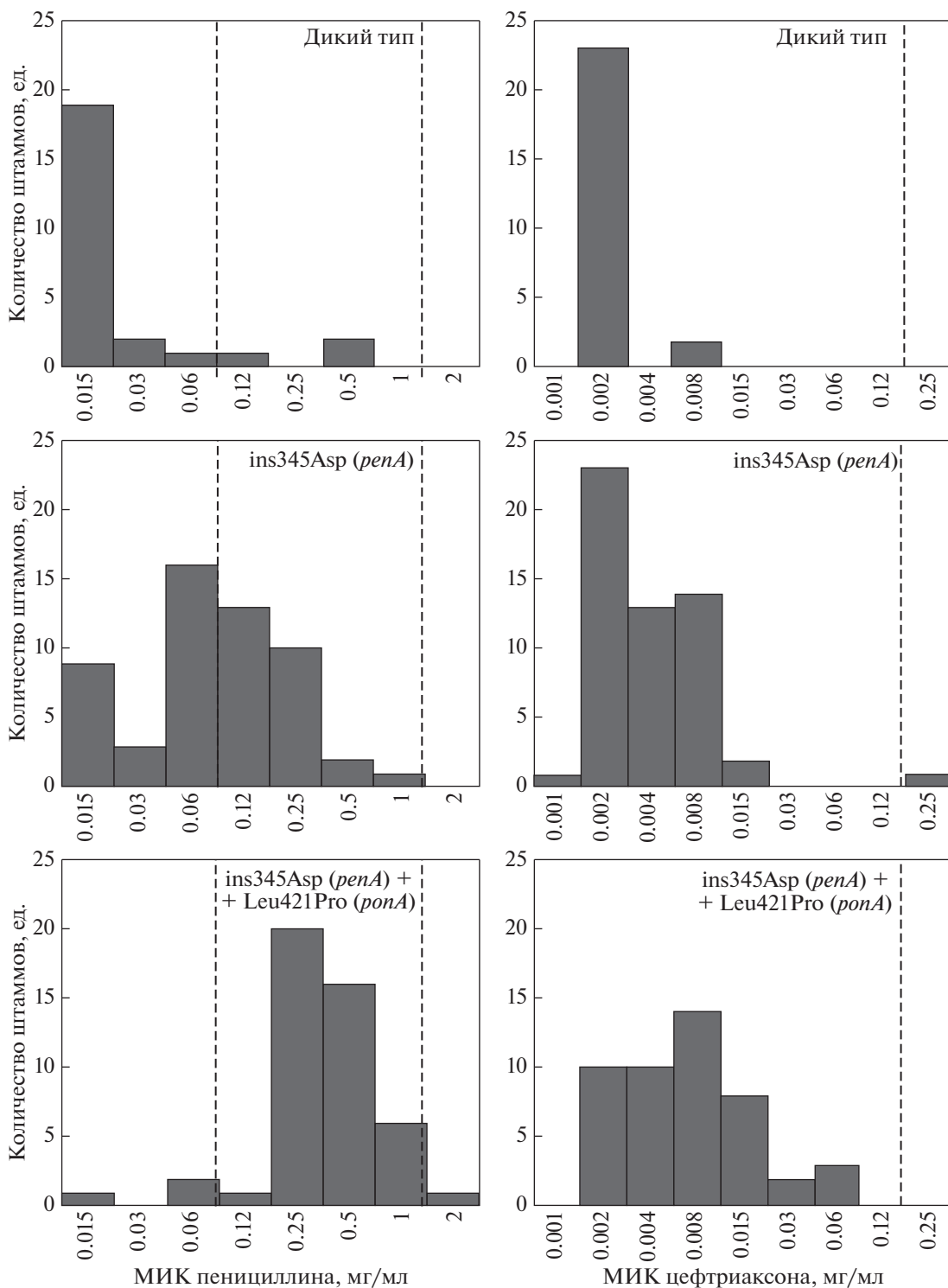


Рис. 3. Распределение значений МИК пеницилина (слева) и цефтриаксона (справа) в отношении *N. gonorrhoeae* дикого типа (верхний ряд), несущих мутацию *ins345Asp (penA)* (средний ряд) или совокупность мутаций *ins345Asp(penA) + Leu421Pro (ponA)* (нижний ряд).

(*gyrA*), Asp95Gly(*gyrA*) и Ser87Arg (*parC*), что свидетельствует о высокой вероятности их совместного присутствия в бактериальной хромосоме ряда проанализированных штаммов. Кроме того, в

анализируемой выборке обнаружен ряд статистически значимых коэффициентов, указывающих на корреляцию между фенотипической устойчивостью к пенициллину и резистентностью к ци-

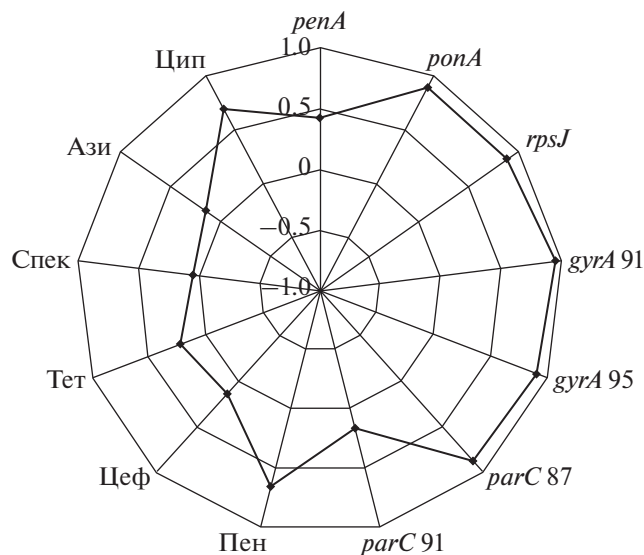


Рис. 4. Структура “фактора мультирезистентности”, характеризующего взаимосвязь генетических детерминант лекарственной устойчивости и признаков устойчивости к антимикробным препаратам в исследуемой популяции *N. gonorrhoeae*. Обозначения по осям – значения факторных нагрузок (от +1.0 до –1.0), указывающие степень типичности наличия или отсутствия анализируемых генотипических и фенотипических свойств в структуре фактора.

профлоксацину и тетрациклину, а также на наличие положительных взаимосвязей между устойчивостью к ципрофлоксацину, азитромицину и тетрациклину.

Приведенные выше данные послужили основанием для предположения о природе мультирезистентности в исследуемой популяции *N. gonorrhoeae*, для итогового описания которой был применен метод факторного анализа (метод главных компонент). При этом в качестве наиболее значимого (собственное значение 5.3, доля объясняемой дисперсии выборки – 40.8%) был идентифицирован фактор (рис. 4), имеющий положительные значения факторных нагрузок для всех анализируемых генетических детерминант с максимальным значением таковых (0.875–0.951) для мутаций Leu421Pro (*ponA*), Val57Met/Leu (*rpsJ*), Ser91Phe (*gyrA*), Asp95Gly (*gyrA*) и Ser87Arg (*parC*). Кроме того, структуру данного фактора формировали признаки устойчивости к пенициллину (факторная нагрузка 0.668) и ципрофлоксацину (0.691), дополняемые положительными значениями факторной нагрузки для признака устойчивости к тетрациклину (0.222). В свою очередь, три дополнительных фактора со значением более 1.0, по-отдельности объясняющие 8.2–9.8% дисперсии анализируемой выборки, были связаны с резистентностью к тетрациклину/азитромицину, спектиномицину и цефтриаксону, в по-

следнем случае с присутствием в структуре данного компонента мутации в гене *penA*.

Таким образом, результаты многомерного статистического анализа позволяют констатировать типичность одновременного присутствия в хромосоме ряда штаммов *N. gonorrhoeae* множественных мутаций в генах, кодирующих “мишени” для антибиотиков, следствием которого является бимодальное, отличное от нормального распределение антибиотикорезистентности в популяции, проявляющееся в существовании нескольких типичных паттернов резистентности возбудителя гонококковой инфекции к антимикробным препаратам. Подобное распределение соответствует представлениям о возможности существования в бактериальных популяциях т.н. “штаммов-гипермутаторов” [28], недостаточность систем репарации которых способствует накоплению в бактериальной хромосоме множественных мутаций, что при их локализации в генах, кодирующих “мишени” для антибиотиков, ведет к формированию мультирезистентного фенотипа.

Клональный характер распространения антибиотикорезистентности в популяции *N. gonorrhoeae*

Условием для распространения данного механизма мультирезистентности в популяции *N. gonorrhoeae* представляется клональный характер ее организации, обеспечивающий вертикальную передачу соответствующих хромосомных детерминант при переносе возбудителя гонококковой инфекции по “сексуальным цепям”. Иллюстрацией сказанного служат результаты анализа генов *porB* и *tbpB*, принятого для оценки эпидемиологического распространения *N. gonorrhoeae* (т.н. система NG-MAST) и позволившего выявить в анализируемой выборке два наиболее многочисленных кластера (группы штаммов с идентичным сиквенс-типом), характеризующие альтернативными профилями антибиотикорезистентности (табл. 3).

Так, штаммы, относящиеся к распространенному в России [29], Белоруссии [30] и Казахстане [31] сиквенс-типу 807, типично несли одиночную мутацию в гене *penA*, следствием которой являлась сниженная чувствительность к пенициллину у 4-х из 10 исследованных штаммов, соответствующая критерию “промежуточная чувствительность” (МИК = 0.12 мг/л). С другой стороны, представители сиквенс-типа 9476, получившего широкое распространение на одной из территорий Российской Федерации как следствие миграции по региональным “сексуальным цепям”, характеризовались одновременным присутствием в хромосомах шести точечных мутаций. В итоге представители данного клона проявляли абсолютную устойчивость к ципрофлоксацину (МИК от 4 до 16 мг/л), промежуточную резистентность к

пенициллину (0.25–1.0 мг/л), а также сниженную чувствительность к тетрациклину (0.25–2.0 мг/л), у двух из 14 из них соответствующую критерию промежуточной, а у одного штамма – абсолютной резистентности к названному антимикробному препарату.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что современная эмпирическая терапия гонококковой инфекции, основанная на преимущественном использовании цефалоспоринов III поколения и формально не ведущая к “селекционному давлению” по генетическим детерминантам, контролирующим устойчивость к ранее использованным препаратам, парадоксальным образом не сопровождается их элиминацией из популяции *N. gonorrhoeae*. Одной из возможных причин этого является исторически сформировавшийся мутационный профиль генов, кодирующих мишени для антибиотиков, что соответствует представлениям о существовании в бактериальных популяциях своеобразных “штаммов-гипермутаторов”. Их предшествующая молекулярная эволюция привела к накоплению в бактериальной хромосоме множественных детерминант резистентности к антибактериальным препаратам, в результате чего мутационные профили и определяемые ими паттерны антибиотикорезистентности в современной популяции *N. gonorrhoeae* приобрели отличное от нормального статистическое распределение.

Другой важной причиной представляется многофакторный характер феномена антибиотикорезистентности, в котором ряд ранее мутировавших генов служит основой для следующего витка молекулярной эволюции, следствием которого может стать полная утрата эффективности антимикробных препаратов в отношении *N. gonorrhoeae*. В частности, это относится к генам *penA* и *ponA*, ранее возникшие мутации в которых оказываются значимыми и в развивающейся устойчивости к цефалоспорином. Дополнительным свидетельством в пользу значимости названных генетических детерминант является чрезвычайно широкое распространение точечной мутации *ins345Asp (penA)* в современной российской популяции *N. gonorrhoeae*, а также типичное присутствие мутации *Leu421Pro (ponA)* в геноме мультирезистентных штаммов. Кроме того, ряд не учтенных в настоящем исследовании хромосомных генов (*penB*, *mtrR*, *porB*), мутации в которых накопились на предыдущих этапах использования антибиотиков, также могут принимать участие в формировании резистентности к цефалоспорином [16].

Таким образом, мы вправе ожидать возникновения устойчивости к современным антимикробным препаратам в первую очередь среди мультирезистентных штаммов *N. gonorrhoeae*, как это имеет место в странах дальнего зарубежья на примере сиквенс-типа 1407 [32–34]. Указанное обстоятельство свидетельствует в пользу актуальности непрерывной системы мониторинга антибиотикорезистентности возбудителя гонококковой инфекции, одним из инструментов которого мо-

Таблица 3. Частота обнаружения генетических детерминант антибиотикорезистентности и признаков устойчивости к антимикробным препаратам у *N. gonorrhoeae*, относящихся к NG-MAST типам 807 и 9476

Анализируемые признаки	Сиквенс-типы <i>N. gonorrhoeae</i>	
	№ (<i>n</i> – количество изолятов в выборке)	
	807 (<i>n</i> = 10)	9476 (<i>n</i> = 14)
Наличие мутаций		
<i>ins345Asp (penA)</i>	10 (100%)	14 (100%)
<i>Leu421Pro (ponA)</i>	–	13 (92.9%)
<i>Val57Met/Leu (rpsJ)</i>	–	12 (85.7%)
<i>Ser91Phe (gyrA)</i>	–	14 (100%)
<i>Asp95Gly (gyrA)</i>	–	14 (100%)
<i>Ser87Arg (parC)</i>	–	14 (100%)
Отсутствие чувствительности к антибиотикам		
Пенициллин	4 (40%)	14 (100%)
Цефтриаксон	–	–
Тетрациклин	–	3 (21.4%)
Спектиномицин	–	–
Азитромицин	–	–
Ципрофлоксацин	–	14 (100%)

жет статью использованная при проведении настоящего исследования технология гидрогелевых ДНК-чипов.

Работа выполнена при поддержке субсидии #14.607.21.0065 (RFMEFI60714X0065) Министерства образования и науки РФ.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. The Lancet Infectious Diseases Commission. (2013) Antibiotic resistance — the need for global solutions. *Lancet Infect. Dis.* **13**, 1057–1098.
2. World Health Organization (WHO). (2014) *Antimicrobial Resistance: Global Report on Surveillance*. Geneva, Switzerland: WHO.
3. World Health Organization (WHO). (2012) *Global Action Plan to Control the Spread and Impact of Antimicrobial Resistance in Neisseria gonorrhoeae*. Geneva, Switzerland: WHO.
4. Unemo M., Nicholas R.A. (2012) Emergence of multi-drug-resistant, extensively drug-resistant and untreatable gonorrhoea. *Future Microbiol.* **7**, 1401–1422.
5. Сидоренко С.В., Тишков В.И. (2004) Молекулярные основы резистентности к антибиотикам. *Успехи биологической химии.* **44**, 263–306.
6. Unemo M., Shafer W.M. (2014) Antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* in the 21st century: past, evolution, and future. *Clin. Microbiol. Rev.* **27**, 587–613.
7. Ropp P.A., Hu M., Olesky M., Nicholas R.A. (2002) Mutations in *ponA*, the gene encoding penicillin-binding protein 1, and a novel locus, *penC*, are required for high-level chromosomally mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 769–777.
8. Brannigan J.A., Tirodimos I.A., Zhang Q.Y., Dawson C.G., Spratt B.G. (1990) Insertion of an extra amino acid is the main cause of the low affinity of penicillin-binding protein 2 in penicillin-resistant strains of *Neisseria gonorrhoeae*. *Mol. Microbiol.* **4**, 913–919.
9. Hu M., Nandi S., Davies C., Nicholas R.A. (2005) 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 *mtiR* and *penB* resistance determinants. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 4327–4334.
10. Бодоев И.Н., Ильина Е.Н. (2015) Молекулярные механизмы формирования лекарственной устойчивости *Neisseria gonorrhoeae*: история и взгляд в будущее. *Молекуляр. генетика, микробиол. и вирусол.* **3**, 22–27.
11. Dan M. (2004) The use of fluoroquinolones in gonorrhoea: the increasing problem of resistance. *Exp. Opin. Pharmacother.* **5**, 829–854.
12. Centers for disease control and prevention. (2010) Sexually transmitted diseases treatment guidelines. *MMWR Recomm Rep.* **59**, 1–114.
13. Министерство здравоохранения РФ. (2010) *Резистентность возбудителей ИППП к антибактериальным препаратам*. Информационный бюллетень. Москва: ООО “ДЭКС-ПРЕСС”.
14. Allen V.G., Farrell D.J., Rebbapragada A., Tan J., Tillet N., Perusini S.J., Towns L., Lo S., Low D.E., Melano R.G. (2011) Molecular analysis of antimicrobial resistance mechanisms in *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Ontario, Canada. *Antimicrob. Agents Chemother.* **55**, 703–712.
15. Zhao L., Zhao S. (2012) TaqMan real-time quantitative PCR assay for detection of fluoroquinolone-resistant *Neisseria gonorrhoeae*. *Curr. Microbiol.* **65**, 692–695.
16. Shaskolskiy B., Dementieva E., Leinsoo A., Runina A., Vorobyev D., Plakhova X., Kubanov A., Deryabin D., Gryadunov D. (2016) Drug resistance mechanisms in bacteria causing sexually transmitted diseases and associated with vaginosis. *Front. Microbiol.* **7**, 747. doi 10.3389/fmicb.2016.00747
17. Clinical and Laboratory Standards Institute. (2014) *Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, 24th Informational Supplement*. CLSI document M100-S24. Wayne, PA: CLSI.
18. www.eucast.org/clinical_breakpoints.
19. Gryadunov D., Nicot F., Dubois M., Mikhailovich V., Zasedatelev A., Izopet J. (2010) Hepatitis C virus genotyping using an oligonucleotide microarray based on the NS5B sequence. *J. Clin. Microbiol.* **48**, 3910–3917.
20. 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. (2015) Evaluation of a low-density hydrogel microarray technique for mycobacterium species identification. *J. Clin. Microbiol.* **53**, 1103–1114.
21. Зименков Д.В., Кулагина Е.В., Антонова О.В., Суржиков С.А., Беспятых Ю.А., Шитиков Е.А., Ильина Е.Н., Михайлович В.М., Заседателев А.С., Грядун Д.А. (2014) Анализ генетических детерминант множественной и широкой лекарственной устойчивости возбудителя туберкулеза с использованием олигонуклеотидного микрочипа. *Молекуляр. биология.* **48**, 251–264.
22. Zimenkov D.V., Kulagina E.V., Antonova O.V., Zhuravlev V.Y., Gryadunov D.A. (2016) Simultaneous drug resistance detection and genotyping of *Mycobacterium tuberculosis* using low-density hydrogel microarray. *J. Antimicrob. Chemother.* **71**, 1520–1531.
23. European Centre for disease prevention and control. (2012) *Molecular Typing of Neisseria gonorrhoeae – Results from a Pilot Study 2010–2011*. Stockholm, ECDC.
24. Кубанова А.А., Кубанов А.А., Кожушная О.С., Воробьев Д.В., Соломка В.С., Фриго Н.В. (2014) Роль некоторых аминокислотных замен в пенициллин связывающем белке (PBP2) *Neisseria gonorrhoeae* в возникновении резистентности к цефтриаксону. *Молекуляр. биология.* **48**, 977–982.
25. Galimand M., Gerbaud G., Courvalin P. (2000) Spectinomycin resistance in *Neisseria* spp. due to mutations in 16S rRNA. *Antimicrob. Agents Chemother.* **44**, 1365–1366.
26. Ng L.-K., Martin I., Liu G., Bryden L. (2002) Mutation in 23S rRNA associated with macrolide resistance in *Neisseria gonorrhoeae*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 3020–3025.
27. Chisholm S.A., Dave J., Ison C.A. (2010) High-level azithromycin resistance occurs in *Neisseria gonorrhoeae*

- as a result of a single point mutation in the 23S rRNA genes. *Antimicrob. Agents Chemother.* **54**, 3812–3816.
28. Macia M.D., Blanquer D., Togores B., Sauleda J., Perez J.L., Oliver A. (2005) Hypermutation is a key factor in development of multiple-antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa* strains causing chronic lung infections. *Antimicrob. Agents Chemother.* **49**, 3382–3386.
 29. Kubanova A., Kubanov A., Frigo N., Solomka V., Semina V., Vorobyev D., Khairullin R., Unemo M. (2014) Russian gonococcal antimicrobial susceptibility programme (RU-GASP) resistance in *Neisseria gonorrhoeae* during 2009–2012 and NG-MAST genotypes in 2011 and 2012. *BMC Infect Dis.* **14**, 342.
 30. Lebedzeu F., Golparian D., Titov L., Pankratava N., Glazkova S., Shimanskaya I., Charniakova N., Lukyanau A., Domeika M., Unemo M. (2015) Antimicrobial susceptibility/resistance and NG-MAST characterisation of *Neisseria gonorrhoeae* in Belarus, Eastern Europe, 2010–2013. *BMC Infect. Dis.* **15**, 29.
 31. Kushnir A.V., Muminov T.A., Bayev A.I. Khrapov E.A., Filipenko M.L. (2012) Molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Almaty, Kazakhstan, by VNTR analysis, Opa-typing and NG-MAST. *Infect Gen Evol.* **12**, 570–576.
 32. Lindberg R., Fredlund H., Nicholas R., Unemo M. (2007) *Neisseria gonorrhoeae* isolates with reduced susceptibility to cefixime and ceftriaxone: association with genetic polymorphisms in *penA*, *mtrR*, *porB1b*, and *ponA*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**, 2117–2122.
 33. Chen C.C., Yen M.Y., Wong W.W., Li L.H., Huang Y.L., Chen K.W., Li S.Y. (2013) Tracing subsequent dissemination of a cluster of gonococcal infections caused by an ST1407-related clone harbouring mosaic *penA* alleles in Taiwan. *J. Antimicrob. Chemother.* **68**, 1567–1571.
 34. Jeverica S., Golparian D., Matičič M., Potočnik M., Mlakar B., Unemo M. (2014) Phenotypic and molecular characterization of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Slovenia, 2006–12: rise and fall of the multidrug-resistant NG-MAST genogroup 1407 clone? *J. Antimicrob. Chemother.* **69**, 1517–1525.

Drug Resistance Mutations and Susceptibility Phenotypes of *Neisseria gonorrhoeae* Isolates in Russia

A. A. Kubanov¹, A. T. Leinsoo², A. V. Chestkov¹, E. I. Dementieva², B. L. Shaskolskiy²,
V. S. Solomka¹, D. A. Gryadunov², D. G. Deryabin^{1, *}

¹State Research Center of Dermatovenerology and Cosmetology, Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, 107076 Russia

²Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: dgderabin@yandex.ru

Steady growth in the degree of antimicrobial resistance in *Neisseria gonorrhoeae* calls for the control of the spreading of resistance mutations. Here we present the data describing drug resistance mutations, the results of antimicrobial susceptibility tests, and molecular genotypes of 128 recent *N. gonorrhoeae* isolates collected across 9 regions of the Russian Federation. The mutations in chromosome genes *penA*, *ponA*, *rpsJ*, *gyrA*, *parC*, which determine the susceptibility of *N. gonorrhoeae* to penicillins, tetracyclines, and fluoroquinolones were detected by multiplex amplification followed by hybridization on a hydrogel DNA-chip. The most frequent mutation was an insertion of an aspartate at position 345 of *penA* gene (76.6%), whereas mutations Leu421Pro in *ponA* gene, Val57Met in *rpsJ* gene, Ser91Phe in *gyrA* gene, Asp95Gly in *gyrA* gene, and Ser87Arg in *parC* gene were detected in 32.8–36.7% of strains. One third of studied *N. gonorrhoeae* isolates harbored multiple drug resistance mutations in bacterial chromosome, resulting in the bimodal distribution of mutation profiles and related patterns of antimicrobial susceptibility. The spread of multiple resistance could be explained by the vertical transfer of the mutations resulting in the clonality of the *N. gonorrhoeae* population.

Keywords: *Neisseria gonorrhoeae*, genetic determinants of drug resistance, phenotypic susceptibility, DNA microarray, statistical analysis, multiple drug resistance