

Первый опыт молекулярного типирования и определения антибиотикорезистентности штаммов возбудителя сифилиса *Treponema pallidum* в Российской Федерации

А.А. Кубанова, А.А. Кубанов, Н.В. Фриго, И.А. Волков, С.В. Ротанов, А.А. Суворова

ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России
107076, Москва, ул. Короленко, д. 3, стр. 6

Представлены результаты молекулярного типирования и определения антибиотикорезистентности 190 штаммов *T. pallidum*, полученных на территории Российской Федерации в 2011—2012 гг. от больных первичным и вторичным сифилисом. Молекулярное типирование штаммов *T. pallidum* проведено по двум вариабельным генам *T. pallidum*: *arp*, *tpr* и дополнено анализом последовательности рамки считывания гена *tp0548*. Определение антибиотикорезистентности штаммов возбудителя сифилиса проводилось путем секвенирования гена, кодирующего 23S rRNA *T. pallidum* в позициях A2058G и A2059G/C (резистентность к макролидам), гена, кодирующего 16S rRNA *T. pallidum* в позиции G1058C, и определения детерминанты *tetB* (резистентность к тетрациклинам), а также путем полноразмерного секвенирования генов, кодирующих белки-мишени β-лактамов Trp47 и Tromp. В результате молекулярного типирования на территории Российской Федерации выявлено 10 субтипов *T. pallidum*. Установлено, что доминирующим является молекулярный тип 14 (98,4%), подтип 14d/f (91,03%); доля субтипов 14d/T и 14b/f молекулярного типа 14 составила: 2,10 и 3,16% соответственно; на долю каждого из остальных субтипов (11d/f, 13d/f, 14a/a, 14a/f, 14d/g, 14d/c, 20d/f) приходилось по 0,53%. Молекулярные маркеры резистентности *T. pallidum* к антибиотикам выявлены у штаммов, полученных из Центрального, Сибирского и Приволжского федеральных округов России: к макролидам — в трех штаммах, полученных в 2011 г.; к тетрациклинам — в двух штаммах, полученных в 2011 г., и в одном штамме, полученном в 2012 г.

Ключевые слова: сифилис, *T. pallidum*, молекулярное типирование, секвенирование, антибиотикорезистентность, гены *T. pallidum arp*, *tpr*, *tp0548*, 23S rRNA, 16S rRNA, Trp47, Tromp.

Контактная информация: rotanov@snikvi.ru. Вестник дерматологии и венерологии 2013; (3): 34—46.

First experience of molecular typing and determining the antibiotic resistance of syphilis pathogen *Treponema pallidum* in the Russian Federation

A.A. Kubanova, A.A. Kubanov, N.V. Frigo, I.A. Volkov, S.V. Rotanov, A.A. Suvorova

State Research Center of Dermatovenereology and Cosmetology, Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Korolenko str. 3, bldg 6, Moscow, 107076, Russia

The authors present the results of molecular typing and determining the antibiotic resistance of 190 *T. pallidum* strains sampled from primary and secondary syphilitic patients in the Russian Federation in 2011—2012. Molecular typing of *T. pallidum* strains was based on two variable gens: *arp*, *tpr*, and was supplemented with an analysis of gene *tp0548* reading frame. Antibiotic resistance of syphilis strains was determined by means of sequencing the gene encoding 23S rRNA *T. pallidum* in such loci as *A2058G* and *A2059G/C* (resistance to macrolides), gene encoding 16S rRNA *T. pallidum* in locus *G1058C*, and determinant *tetB* (resistance to tetracyclines) as well as full-scale sequencing the genes encoding target proteins of β -lactams Tp47 and Tromp.

As a result of molecular typing in the territory of the Russian Federation, ten subtypes of *T. pallidum* were revealed. Type 14 (98.4%) predominates; the share of subtype 14d/f is 91.03%; the share of subtypes 14d/T and 14b/f, Type 14, was 2.10 and 3.16%, respectively; the share of all other subtypes (11d/f, 13d/f, 14a/a, 14a/f, 14d/g, 14d/c, 20d/f) was 0.53%. Molecular markers of *T. pallidum* antibiotic resistance were revealed among the strains coming from the Central, Siberian and Volga federal regions of Russia: macrolides – three strains sampled in 2011; tetracyclines – two strains sampled in 2011 and one strain sampled in 2012.

Key words: syphilis, *T. pallidum*, molecular typing, sequencing, antibiotic resistance, genes *T. pallidum* *arp*, *tpr*, *tp0548*, 23S rRNA, 16S rRNA, Tp47, Tromp.

Corresponding author: rotanov@cnikvi.ru. Vestnik Dermatologii i Venerologii 2013; 3: 34—46.

■ Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Предупреждение и борьба с социально значимыми заболеваниями (2007—2012 гг.)» и Государственного задания ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России на 2012—2014 гг.: Раздел I. Выполнение фундаментальных научных исследований. Наименование государственной работы: «Изучение генетической variability возбудителей инфекций, передаваемых половым путем, циркулирующих на территории Российской Федерации» (Государственный контракт 114/БУ-2012-051 от 16.01.2012 г.).

Сифилис — инфекционное заболевание, передаваемое половым путем и являющееся причиной тяжелых поражений нервной системы и висцеральных органов, внутриутробного инфицирования плода. Несмотря на проводимые профилактические мероприятия, сифилис остается эндемичным заболеванием во многих развивающихся странах; в развитых странах регистрируются эпидемии сифилиса. В Российской

Федерации уровень заболеваемости сифилисом остается достаточно высоким и, по данным государственной статистики 2011 г., составляет 37,6 на 100 000 населения. Данное обстоятельство вызывает необходимость изучения изменчивости возбудителя сифилиса *T. pallidum*, в первую очередь направленного на выявление отдельных молекулярных типов возбудителя.

Молекулярное типирование бледной трепонемы, выделенной от больных сифилисом, впервые было проведено А. Pillay и соавт. в рамках исследований центров по контролю заболеваний (США, Атланта) [1, 2]. Показано, что ген *arp* (*acidic repeat protein*), кодирующий кислый белок с неизвестными функциями, содержит уникальные повторы, состоящие из 60 пар оснований, причем количество этих повторов варьирует у разных штаммов *T. pallidum*. Подобная variability характерна и для семейства *tpr* генов (*T. pallidum repeat*). В состав семейства *tpr* входит 12 генов, часть которых, как предполагают, кодирует

экспонированные на поверхности белки. А. Pillay с соавт. была разработана методика исследования, заключающаяся в обнаружении ДНК бледной трепонемы в образцах соскобов сифилитических высыпаний больных первичным и вторичным сифилисом путем амплификации региона гена *poIA* в полимеразной цепной реакции (ПЦР) и последующего проведения молекулярного типирования *T. pallidum* по двум вариабельным генам-мишеням: гену *arp* и семейству генов *tpr*. Группой А. Pillay проведено молекулярное типирование *T. pallidum* на 201 биообразце, полученном от больных сифилисом в клиниках пяти городов Южной Африки [2]. В ходе исследования было установлено 15 типов штаммов *T. pallidum*, идентифицированных на основании выявленных вариантов гена *arp* (содержавших по 6—8, 10—20 или 22 повторяющихся 60-нуклеотидных участка гена), а также 10 вариантов фрагмента гена *tpr*. Путем сопоставления результатов определения *arp* повторов и вариантов гена *tpr* в ходе исследования было идентифицировано 35 субтипов *T. pallidum*. В большинстве исследованных образцов определялся субтип 14d.

Анализ последовательности нуклеотидов гена *trp0548 T. pallidum* [3] привел к тому, что наиболее распространенный подтип 14d был разделен на 4 отдельные подгруппы (14d/c, 14d/f, 14d/g, 14d/i), а подтипы 12a и 14a были дополнительно разделены на 2 группы каждый.

В работе R. Peng и соавт. приведены результаты метаанализа публикаций, касавшихся молекулярного типирования *T. pallidum* и эпидемиологии сифилиса в разных странах мира, содержащихся в пяти информационных базах данных (PubMed, Embase, EBSCO, Google Scholar, CNKI) за период с 1998 г. (дата выхода первой публикации о типировании *T. pallidum*) по 2010 г. [4]. На основании анализа сведений, приведенных в 14 отобранных для метаанализа статьях, были выявлены 27 наиболее распространенных субтипов бледной трепонемы; среди них преобладали субтипы: 14d, 14f, 14a, 13d и 15d. При этом в Китае доминантным субтипом являлся 14f, на втором месте — 14d [5], в США доминировал 14f [6], в Канаде — 14d [7], в ЮАР — 14d, на втором месте — 14a, на третьем — 14i [2, 8], на Мадагаскаре — 14d [1], в Португалии — 14a, на втором месте — 14d [9], в Шотландии — также субтип 14d [10]. Самым распространенным почти для всех территорий, где проводились исследования, оказался штамм 14d. Авторы предполагают, что штамм 14d, вероятно, был исходным штаммом бледной трепонемы, по крайней мере, для исследованных территорий.

По мнению исследователей, применение методов молекулярного типирования возбудителей инфекционных заболеваний способствует лучшему пониманию закономерностей распространения разных субтипов возбудителя из одного региона или страны в другие, позволяет изучить зависимость гетерогенности суб-

типов от географического расположения региона, установить возможную связь субтипов возбудителя с вирулентностью, определить особенности передачи инфекции между половыми партнерами.

В отсутствие противосифилитической вакцины контроль над распространением сифилиса в значительной степени зависит от своевременного выявления новых случаев заболевания и лечения антибиотиками больных сифилисом и их половых партнеров. Пенициллин и другие β-лактамы антибиотики до сих пор являются основными препаратами, используемыми для лечения сифилитической инфекции в Российской Федерации [11]. Несмотря на более чем 60-летний мировой опыт применения пенициллина для лечения сифилиса, клинически доказанных случаев неудач лечения больных сифилисом данным антимикробным препаратом, связанных с появлением резистентности *T. pallidum* к пенициллину, до сих пор не описано. Однако имеются факты, указывающие на возможность развития резистентности бледной трепонемы к антимикробным препаратам. Об этом свидетельствуют неудачи лечения сифилиса эритромицином [12, 13], подтверждение *in vitro* устойчивости *T. pallidum* к макролидам, обусловленной мутацией в генах, кодирующих 23S rRNA [14], обнаружение *T. denticola*, устойчивых к тетрациклину и эритромицину [15, 16], выявление плазмид, обеспечивающих устойчивость к β-лактамам ряда штаммов *T. pallidum* [17]. В связи с вышеизложенным исследование резистентности *T. pallidum* к антимикробным препаратам является важным, так как распространение антибиотикорезистентных штаммов *T. pallidum* может привести к неконтролируемому росту заболеваемости сифилисом. *T. pallidum* является некультивируемым на искусственных питательных средах патогеном, поэтому изучение антибиотикорезистентности может осуществляться только с помощью молекулярно-биологических методов.

Исследования, направленные на определение молекулярных типов штаммов бледной трепонемы, полученных на территории Российской Федерации, и их резистентности к антимикробным препаратам, до настоящего времени не проводились.

Целью настоящего исследования явилось изучение распространения молекулярных типов штаммов *T. pallidum*, полученных от больных сифилисом на территории Российской Федерации, и резистентности штаммов *T. pallidum* к антимикробным препаратам (макролидам, тетрациклинам, β-лактамам).

Материал и методы

В 2011—2012 гг. от больных с лабораторно подтвержденным диагнозом первичного сифилиса половых органов, первичного сифилиса анальной области, первичного сифилиса других локализаций и вторичного сифилиса кожи и слизистых оболочек было получено 190 биологических образцов, содержащих ДНК

T. pallidum. Биологические образцы представляли собой межтканевую серозную жидкость, полученную путем поскабливания стерильной ложкой Фолькмана поверхности эрозивных и язвенных высыпных элементов, расположенных на коже и слизистых оболочках больных первичным и вторичным сифилисом. Получение и хранение штаммов *T. pallidum* в медицинских организациях дерматовенерологического профиля субъектов Российской Федерации, а также их транспортировка в ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России осуществляли в соответствии с ранее разработанными в ГНЦДК стандартными операционными процедурами. Транспортировку биологического материала, содержащего *T. pallidum*, в ГНЦДК осуществляли в условиях низкой температуры, гарантирующей сохранность генетического материала возбудителя сифилиса.

Для получения референсной контрольной геномной ДНК *Treponema pallidum subsp. pallidum* при проведении исследований использовали штамм *Nichols* патогенной *T. pallidum*, выделенный из ткани лабораторных кроликов, на которых перевивалась указанная культура. Для получения контрольной геномной ДНК использовали штамм *Escherichia coli* XL1-Blue.

Дизайн исследования

С целью установления молекулярных типов штаммов *T. pallidum*, циркулирующих на территории Российской Федерации, была изучена их вариабельность с использованием молекулярных методов типирования по трем генам: *arp*, *tpr* и *tp0548*.

Изучение вариабельности штаммов *T. pallidum* по гену *arp* проводили методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) с последующей детекцией продуктов амплификации участка гена *arp* методом гелелектрофореза и присвоением штамму *T. pallidum* цифрового кода, соответствующего количеству 60-нуклеотидных повторов в гене *arp*.

Типирование штаммов *T. pallidum* по гену *tpr* проводили на основании анализа полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДРФ) участка гена *tpr*, для чего продукты амплификации ПЦР обрабатывали ферментом рестриктазой; по итогам исследований штамму *T. pallidum* присваивали буквенное обозначение субтипа (*Tru9I* ПДРФ: *a, b, c, d, e, g, h, i, j, k, l* или *p*).

Молекулярное типирование штаммов *T. pallidum* по гену *tp0548* было осуществлено путем определения нуклеотидной последовательности вариабельного участка гена *tp0548* методом секвенирования; в результате исследования штамму *T. pallidum* присваивали дополнительное буквенное обозначение.

По итогам исследования каждому штамму *T. pallidum* присваивали обозначение молекулярного типа, состоявшее из одного цифрового и двух буквенных символов.

Для определения резистентности штаммов *T. pallidum* к макролидам с применением метода сек-

венирования были изучены две известные мутации в генах, кодирующие 23S rRNA *T. pallidum* в положениях A2058G и A2059G/C, обуславливающие развитие резистентности *T. pallidum* к макролидам.

Для определения резистентности штаммов *T. pallidum* к тетрациклинам было изучено наличие детерминанты *tetB* (с помощью метода ПЦР), являющейся молекулярным маркером резистентности микроорганизма к тетрациклинам. Кроме того, при помощи метода секвенирования было изучено наличие точечной мутации в гене, кодирующем 16S rRNA в позиции G1058C, которая также может ассоциироваться с развитием резистентности *T. pallidum* к тетрациклинам.

С целью определения резистентности штаммов *T. pallidum* к β-лактамам были изучены структуры генов *Trp47* и *Tromp*, которые кодируют мишени действия β-лактамов. Для выявления возможных мутаций в генах *Trp47* и *Tromp* было проведено их полноразмерное секвенирование с последующим сравнением полученных нуклеотидных последовательностей с референсным штаммом *T. pallidum*.

Методы исследования

Выделение геномной ДНК *T. pallidum* и *E. coli* проводили с использованием набора «ДНК-сорб-АМ» (НПФ «Литех»), согласно инструкции производителя. Выделение геномной ДНК *T. pallidum* из гомогенизированной ткани кролика, инфицированного *T. pallidum*, проводили при 37 °С в течение ночи с использованием набора Diatom™ DNA Prep 100 (фирма «Изоген»): к 25–35 мг измельченной ткани добавляли 400 мкл лизирующего буфера (трис-НСl рН8,0 — 50 мМ; ЭДТА — 100 мМ; SDS 1%) и 12 мкл протеиназы К (100 мкг/мл). Образцы выделенной ДНК до проведения исследования хранили при –20 °С.

Определение ДНК *T. pallidum* в полученных биообразцах осуществляли в ПЦР с праймерами к гену *polA* (регион 1156–1531 пара оснований), кодирующему фермент ДНК-полимеразу I *T. pallidum* (табл. 1).

В качестве матрицы при проведении ПЦР использовали тотальную бактериальную ДНК, выделенную из биологических образцов. После проведения ПЦР с помощью электрофоретического анализа выявляли *polA*-положительные образцы, что служило подтверждением наличия в биообразце ДНК бледной трепонемы. На рис. 1 представлена электрофореграмма, на основании анализа которой биологические пробы отбирались для дальнейшего исследования.

С целью проведения молекулярного типирования штаммов *T. pallidum* по генам *arp*, *tpr* и *tp0548* и определения молекулярных детерминант антибиотикорезистентности штаммов *T. pallidum* к макролидам (ген, кодирующий 23S rRNA, в положениях A2058G и A2059G/C), тетрациклинам (ген, кодирующий 16S rRNA, позиция G1058C, детерминанта *tetB*) и β-лактамам (гены *Trp47* и *Tromp*) с помощью про-

Таблица 1 Праймеры к гену *polA* *T. pallidum*

Ген	Последовательность 5'—3'
<i>polA</i>	tgс gсg tgt gсg аat ggt gtg gtc
	сac agt gct caa ааа сgc ctg сac g

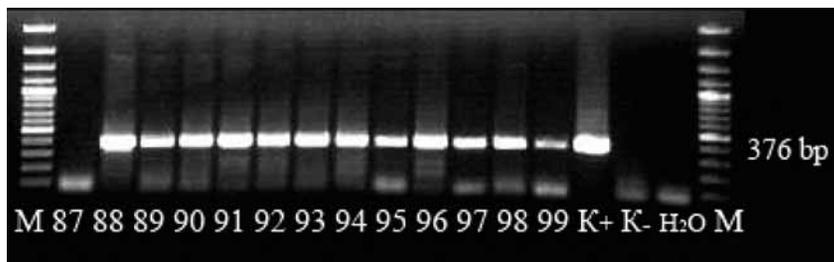


Рис. 1. Электрофореграмма продуктов амплификации участка гена *polA* *T. pallidum*. Цифрами обозначены номера исследованных биообразцов. K+ — положительный контроль, (референсная геномная ДНК *T. pallidum* subsp. *pallidum* str. *Nichols*), K- и H₂O — отрицательные контроли, не содержащие ДНК *T. pallidum* (контрольная ДНК *E. coli* и вода соответственно), M — маркеры длин ДНК; 376 bp — расчетный размер продукта амплификации в парах нуклеотидов

граммы *Oligob* были подобраны и использованы пары праймеров (табл. 2).

Полимеразная цепная реакция. Амплификацию фрагментов ДНК изучавшихся фрагментов генов *T. pallidum* проводили с помощью ПЦР. Для этого использовали фермент Taq-полимеразу и буфер к ней фирмы Fermentas. Конечный объем реакционной смеси в ПЦР составил 25 мкл; условия проведения ПЦР для получения амплифицированных фрагментов ДНК соответствующих генов *T. pallidum* представлены в табл. 3. ПЦР осуществляли на амплификаторах i-Cycler и Dyad (фирма Bio-Rad), «Терцик» (фирма «ДНК-Технология»).

Для расщепления ДНК *T. pallidum* использовали эндонуклеазу рестрикции *Tru9I* (фирма SibEnzym) из расчета 1 Е фермента на 1 мкг ДНК. Инкубацию ДНК с ферментом проводили при температуре 65 °С в течение 1—2 ч., инактивацию фермента — при 80 °С в течение 20 мин.

Гель-электрофорез осуществляли в горизонтальных агарозных гелях с концентрацией агарозы от 1 до 2% и содержанием бромида этидия 0,5 мкг/мл в течение 30—60 мин. при комнатной температуре в трис-ацетатном буфере (0,04 М трис-ацетат pH 8,1; 0,002 М ЭДТА) при напряжении электрического поля 170 В в течение 30—60 мин.

Метод секвенирования. С целью определения нуклеотидных последовательностей амплифицированные фрагменты ДНК соответствующих генов об-

рабатывали ферментами (экзонуклеазой I *E. coli* и креветочной щелочной фосфатазой) для получения чистого препарата ДНК, не содержащего компонент амплификационной смеси. Секвенсовую ПЦР осуществляли с использованием меченых терминирующих нуклеотидов, ранее подобранных праймеров (см. табл. 2) и коммерческого набора реагентов Big Dye Terminator v 3.1 Sequencing RR-100 (Applied Biosystems). Секвенирование фрагментов ДНК в соответствии с разработанным протоколом проводили на приборе 3730 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием программного обеспечения 3730 Data Collection v 3.0. Анализ нуклеотидных последовательностей осуществляли с помощью программ Sequencing Analysis 5.3.1, Vector NTI 9.1 и DNA Star Edit Seq. Выравнивание нуклеотидных последовательностей выполнялось с помощью программы Mega5 Alignment Explorer (рис. 2).

Результаты молекулярного типирования штаммов *T. pallidum*. После выделения суммарной геномной бактериальной ДНК из биообразцов, полученных от больных сифилисом, наличие ДНК *T. pallidum* было подтверждено методом ПЦР в 190 биообразцах. Амплифицированные в результате ПЦР фрагменты ДНК *T. pallidum* были оценены с помощью молекулярно-биологических методов, позволяющих дифференцировать штаммы *T. pallidum* по трем вариабельным генам: *arp*, *tpr* и *tp0548*.

В результате исследования выборки штаммов *T. pallidum* по гену *arp* каждому штамму *T. pallidum* был

Таблица 2

 Праймеры, использованные в работе для проведения молекулярного типирования по генам *arp*, *tpr* и *tp0548* и определения молекулярных детерминант антибиотикорезистентности штаммов *T. pallidum*

Ген	Последовательность праймеров
<i>arp</i>	caa gtc agg acg gac tgt cc
	ggt atc acc tgg gga tgc
<i>tpr</i> внешние	act ggc tct gcc aca ctt ga
	cta cca gga gag ggt gac gc
<i>tpr</i> внутренние	cag gtt ttg ccg tta agc
	aat caa ggg aga ata ccg tc
<i>tp0548</i>	ggt ccc tat gat atc gtg ttc g
	gtc atg gat ctg cga gtg g
<i>23S rRNA</i>	gtc tcc cac cta tac tac aca t
	gga gag gtt cgt ggt aac aca
<i>tetB</i>	atc ctt tct ggg ctt cca ttg
	ccg agc agg gat ttc tcc ac
<i>16S rRNA</i>	acg cga acg cat taa gtg tac cgc
	ccc acc ttc ctc cgg ttt gtc a
<i>tp47</i>	cag aca ttc tcg ctc ctc gta gc
	gcg cat ggc tct gag cat ag
<i>tromp</i>	ctg tag ctg ctt atg cga gga
	acg gct ctt cta ccc act caa

присвоен код, соответствующий количеству уникальных повторов, состоящих из 60 пар оснований, в гене *arp*; всего было выявлено 4 типа штаммов: 1-й тип штаммов содержал в гене *arp* 11 60-нуклеотидных повторов (тип 11; 1 штамм; 0,53%), 2-й тип штаммов содержал 13 повторов [тип 13; 1 (0,53%) штамм], 3-й тип штаммов содержал 14 повторов [тип 14; 187 (98,4%) штаммов]; и 4-й тип штаммов содержал по 20 повторов [тип 20; 1 (0,53%) штамм].

Типирование *T. pallidum* по гену *tpr* заключалось в определении полиморфизма длин рестрикционных фрагментов (ПДФ) участка гена *tpr* величиной 1848 пар оснований и определении методом «гнездовой» ПЦР молекулярного типа штамма *T. pallidum* (12 вариантов: *a*, *b*, *c*, *d*, *e*, *g*, *h*, *i*, *j*, *k*, *l* или *p*). Распределение типов штаммов *T. pallidum* в зависимости от ПДФ участка гена *tpr* *T. pallidum* представлено в табл. 4.

По результатам анализа данных типирования штаммов *T. pallidum* по гену *tpr* в изучавшейся выборке штаммов *T. pallidum* было выявлено 3 типа штаммов: тип *a* — 1 (0,53%) штамм, тип *b* — 6 (3,16%) штаммов и тип *d* — 183 (96,31%) штамма.

На электрофореграмме (рис. 3) представлены 3 типа штаммов *T. pallidum*, выявленных на основа-

нии определения длины рестрикционных фрагментов участка гена *tpr*: *a*, *b* и *d*.

В результате молекулярного типирования по двум генам (*arp* и *tpr*) каждому штамму *T. pallidum* был присвоен код, состоявший из цифрового и буквенного обозначений; всего в исследовании было выявлено 6 типов штаммов: 11d — 1 (0,53%) штамм, 13d — 1 (0,53%) штамм, 14a — 2 (1,05%) штамма, 14b — 6 (3,16%) штаммов, 14d — 179 (94,20%) штаммов и 20d — 1 (0,53%) штамм.

Типирование нуклеотидных последовательностей участка гена *tp0548* длиной 85 пар оснований в позиции 131–215 позволило выделить дополнительно субтипы *T. pallidum*: *a* — 1 (0,53%) штамм, *c* — 1 (0,53%) штамм, *f* — 183 (96,31%) штамма и *g* — 1 (0,53%) штамм. При анализе нуклеотидных последовательностей фрагмента гена *tp0548* была обнаружена не описанная ранее в литературе замена нуклеотидов в положении 171: вместо цитозина (характерного для типов *a*–*d* и *h*) и гуанина (характерного для типов *e*, *f*, *g* и *i*) в данном положении в 4 (2,10%) штаммах *T. pallidum* находился тимин (T171T). Данная нуклеотидная замена является значимой, так как приводит к замене аминокислоты в белковой молекуле *T. pallidum*. Новому типу штаммов было присвоено буквенное обозначение *T*.

Таблица 3 Условия проведения ПЦР при исследовании генов *T. pallidum*

Компоненты для реакционной смеси	Количество компонентов для исследования в ПЦР генов <i>T. pallidum</i>									
	<i>poIA</i>	<i>arp</i>	<i>tp</i> внешние	<i>tp</i> внутренние	<i>tp0548</i>	<i>23S rRNA</i>	<i>tetB</i>	<i>16S rRNA</i>	<i>tp47</i>	<i>tromp</i>
10x Buffer	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x	1x
dNTP 10мМ	0,2мМ	0,2мМ	0,2мМ	0,2мМ	0,2мМ	0,2мМ	0,2мМ	0,2мМ	0,2мМ	0,2мМ
Праймер fw	10pmol	20 pmol	10pmol	20 pmol	10pmol	10pmol	10pmol	10pmol	10pmol	10pmol
Праймер rev	10pmol	20 pmol	10pmol	20 pmol	10pmol	10pmol	10pmol	10pmol	10pmol	10pmol
Taq полимеразы	2 ед.	2,5 ед.	2 ед.	2,5 ед.	2 ед.	2 ед.	2 ед.	2 ед.	2 ед.	2 ед.
Вода	до конечного объема смеси									
DNA, мкл	5	7	3	3	5	5	3	3	3	2
Конечный объем смеси, мкл	25	25	25	50	25	25	25	25	25	25
Режимы ПЦР	Температура (°C) и время (сек. — '', мин. — ')									
1 цикл	95—15'	95—5'	95—5'	95—5'	95—2'	94—5'	95—5'	95—5'	95—5'	94—5'
Денатурация	95—40''	95—20''	94—1'	94—1'	95—1'	94—20''	94—30''	95—30''	94—30''	94—30''
Отжиг	65—1'	61—20''	64—2'	63—2'	60—2'	61—20''	67—30''	72—30''	68—30''	61—15''
Элонгация	72—1'	72—40''	68—1'	68—1'	72—1'	72—20''	72—30''	72—30''	72—1'	72—1'
Достройка	72—5'	72—7'	68—7'	68—7'	72—10'	72—5'	72—7'	72—10'	72—7'	72—5'
Количество циклов	45	35	35	45	40	35	35	34	35	35
Ожидаемый размер продукта (в парах оснований)	376	от 751	2196	1848	346	276	600	330	1550	1124

Примечание. Указание на режим проведения ПЦР: «95—15'» обозначает температуру этапа реакции 95 °C длительностью 15 минут; а «61—20''» — температуру 61 °C длительностью 20 секунд.

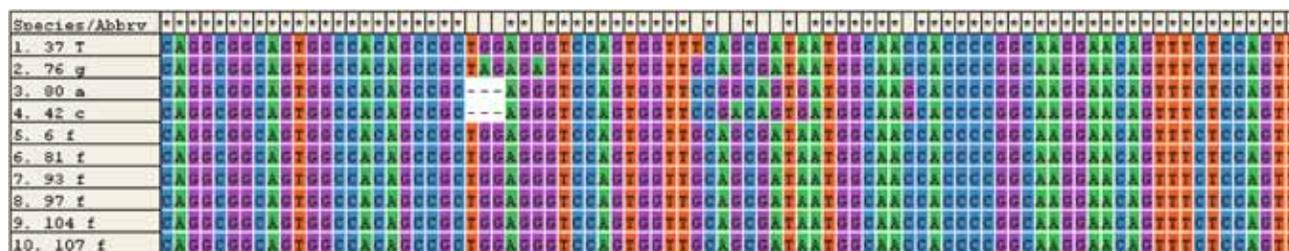


Рис. 2.

Фрагмент интерфейса программы Mega5: Alignment Explorer с результатами выравнивания последовательностей разных типов штаммов *T. pallidum* по гену *tp0548* *T. pallidum*. Слева по вертикали — номера образцов от 1 до 10 с буквенными обозначениями, соответствующими типу изучаемого фрагмента гена *tp0548*; в центральной части представлены нуклеотидные последовательности штаммов *T. pallidum*, соответствующие изучаемому фрагменту гена *tp0548*; цветом выделены нуклеотиды: синим — цитозин, зеленым — аденин, фиолетовым — гуанин, красным — тимин, белым — «брешь-делеция», возникшая при выравнивании нуклеотидных последовательностей

Таблица 4 ПДРФ участка гена *tpr T. pallidum*

Длина рестрикционных фрагментов участка гена <i>tpr T. pallidum</i> (пары оснований)	Тип <i>Tru9I</i> ПДРФ						
	a	b	c	d	e	f	g
911	+	+	+	+	+	+	+
901		+		+		+	
804		+	+	+		+	
722	+	+	+	+	+	+	
524	+		+	+	+	+	
425	+		+			+	+
382	+	+	+	+	+	+	+

Примечание. Буквами обозначены типы штаммов *T. pallidum*, соответствующие полиморфизмам длин фрагментов ДНК, выявленных после обработки продуктов амплификации рестриктазой *Tru9I*. Серым цветом обозначены сочетания длин рестрикционных фрагментов, выявленные в изучавшейся выборке штаммов.

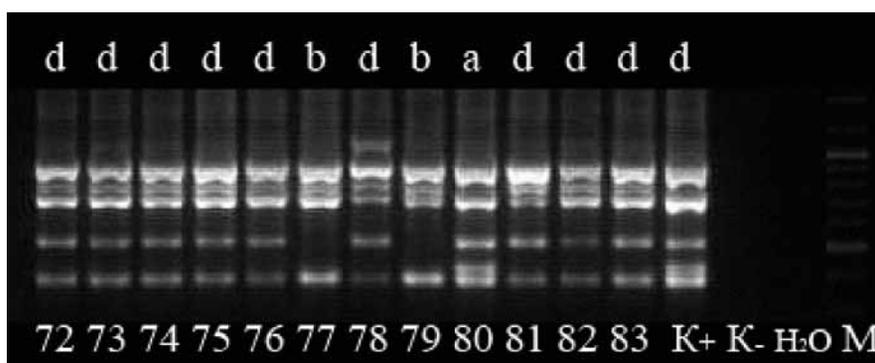


Рис. 3. Электрофореграмма штаммов *T. pallidum* типов *a*, *b* и *d*, выявленных на основании определения ПДРФ участка гена *tpr T. pallidum*.
 Рис. 3. Сверху — буквенное обозначение установленного типа штамма по гену *tpr*, снизу цифрами обозначены номера биологических образцов, K+ — положительный контроль (референсная геномная ДНК *T. pallidum subsp. pallidum str. Nichols*); K- и H₂O — отрицательные контроли, не содержавшие ДНК *T. pallidum* (контрольная ДНК *E. coli* и вода соответственно); M — маркер длин ДНК

Таким образом, на основании результатов молекулярного типирования по трем генам (*arp*, *tpr* и *tp0548*) каждому штамму *T. pallidum* был присвоен индивидуальный код, состоящий из трех обозначений (одного цифрового и двух буквенных). Распределение молекулярных типов штаммов *T. pallidum* приведено в табл. 5.

Таким образом, как следует из приведенных данных, в результате молекулярного типирования российской выборки штаммов *T. pallidum* по трем генам (*arp*, *tpr* и *tp0548*) было выявлено 10 молекулярных типов *T. pallidum*. Доминирующим молекулярным типом среди штаммов *T. pallidum*, обнаруженных на территории Российской Федерации, так же как и во многих других странах мира (рис. 4), являлся молекулярный тип 14 (98,4%),

подтип 14d/f (91,03%); доля субтипов 14b/f и 14d/T молекулярного типа 14 составила 3,16 и 2,10% соответственно; на долю каждого из остальных субтипов (11d/f, 13d/f, 14a/a, 14a/f, 14d/c, 14d/g и 20d/f) приходилось по 0,53%.

Результаты определения маркеров антибиотикорезистентности штаммов *T. pallidum*. Поскольку основными препаратами, используемыми в настоящее время для лечения больных сифилисом, являются β-лактамы антибиотики (пенициллин, цефтриаксон), макролиды и тетрациклины, определение известных и вероятных генетических детерминант резистентности штаммов *T. pallidum* было осуществлено по отношению к данным трем группам антимикробных препаратов.

Для определения резистентности штаммов *T. pallidum* к макролидам были изучены две из-

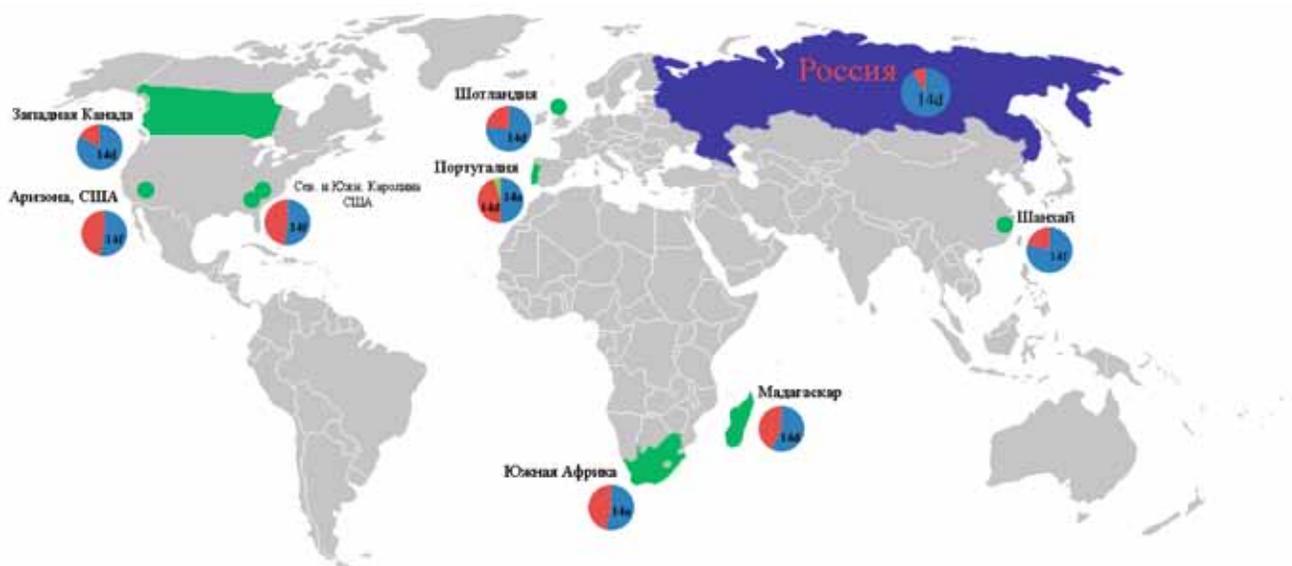
Таблица 5 Результаты молекулярного типирования штаммов *T. pallidum* по трем генам: *arp*, *tpr* и *tp0548*

	Тип штамма											
	по гену <i>arp</i>			по гену <i>tpr</i>			по гену <i>tp0548</i>			по трем генам (<i>arp</i> , <i>tpr</i> , <i>tp0548</i>)		
	тип	количество		тип	количество		тип	количество		тип	количество	
		абс.	%		абс.	%		абс.	%		абс.	%
	11	1	0,53	a	1	0,53	a	1	0,53	11d/f	1	0,53
	13	1	0,53	b	6	3,16	c	1	0,53	13d/f	1	0,53
	14	187	98,40	d	183	96,31	f	183	96,31	14a/a	1	0,53
	20	1	0,53				g	1	0,53	14a/f	1	0,53
							T	4	2,10	14b/f	6	3,16
										14d/c	1	0,53
										14d/f	173	91,03
										14d/g	1	0,53
										14d/T	4	2,10
										20d/f	1	0,53
Всего	4	190	100	3	190	100	5	190	100	10	190	100

вестные мутации в генах, кодирующих 23S рРНК *T. pallidum*, в положениях A2058G и A2059G/C, обуславливающие развитие резистентности *T. pallidum* к макролидам. Для этого были применены методы ПЦР и секвенирования с использованием праймеров

к участку гена, кодирующего 23S rRNA и содержащего сайты предполагаемых мутаций.

При анализе полученных после проведения реакции секвенирования расшифрованных последовательностей участка гена, кодирующего 23S rRNA,

Рис. 4. Распространение наиболее часто встречающихся субтипов штаммов *T. pallidum* в странах мира

было обнаружено 3 штамма с мутацией в положении A2058G. Данные штаммы были получены из Приволжского, Центрального и Сибирского федеральных округов.

Мутаций в позиции 2059 гена, кодирующего 23S rRNA, обнаружено не было ни у одного из штаммов *T. pallidum*.

Для определения резистентности штаммов *T. pallidum* к тетрациклинам было изучено наличие детерминанты *tetB*, ответственной за развитие устойчивости микроорганизмов к тетрациклинам и имеющей у *T. pallidum* хромосомную локализацию. Детерминанта *tetB* кодирует фермент, который переводит тетрациклины в неактивную форму; выявление этого гена свидетельствует о наличии резистентности микроорганизма к тетрациклинам. Определение гена *tetB* *T. pallidum* осуществлялось методом ПЦР с использованием соответствующих праймеров. В качестве положительного контроля использовали геномную ДНК *E. coli* штамм XL1-Blue, содержащую транспозон *Tn10*, в состав которого входит ген *tetB*. В качестве отрицательного контроля использовали *T. pallidum* *str. Nichols*. Выявление продукта в случае XL1-Blue говорило об успешном прохождении полимеразной реакции (рис. 5).

По результатам проведенного исследования был выявлен 1 штамм *T. pallidum*, содержащий детерминанту *tetB*. Штамм был получен из Дальневосточного федерального округа Российской Федерации (Хабаровский край).

Кроме гена *tetB*, обуславливающего развитие резистентности микроорганизмов к тетрациклинам, было определено наличие точечной мутации в гене, кодирующем 16S rRNA, которая также может ассоциироваться с развитием резистентности *T. pallidum* к те-

трациклинам. Данный ген кодирует 16S rRNA, входящую в состав 30S субъединицы рибосомы. Действие тетрациклина основано на ингибировании синтеза белка путем связывания с 30S субъединицей рибосомы через 16S rRNA; при этом наличие мутации в гене, кодирующем 16S rRNA, приводит к блокированию действия антибиотика и развитию резистентности. Для изучения точечной мутации в гене, кодирующем 16S rRNA (в позиции G1058C) *T. pallidum*, были использованы ПЦР и метод секвенирования.

В результате анализа последовательностей участка гена, кодирующего 16S rRNA, было обнаружено 2 штамма *T. pallidum*, несущих мутации в положении G1058C, ассоциированном с резистентностью трепонем к антибиотикам класса тетрациклинов (рис. 6). Штаммы были получены из Сибирского и Центрального федеральных округов.

Точная локализация мутаций, которые могут вызвать развитие резистентности *T. pallidum* к β-лактамам, в настоящее время неизвестна. В связи с данным обстоятельством при определении резистентности штаммов *T. pallidum* к β-лактамам была изучена структура генов *Trp47* и *Tromp*, которые кодируют мишени действия β-лактамов и потенциально могут нести ответственность за развитие устойчивости *T. pallidum* к β-лактамам антибиотикам: ген *Trp47* кодирует пенициллинсвязывающий белок РВР, ген *Tromp* кодирует белок Tromp — каналобразующий порин, образующий поры, сквозь которые могут проникать молекулы антибиотика.

Для выявления возможных мутаций в генах *Trp47* и *Tromp* было проведено их секвенирование с применением праймеров к полноразмерным генам с последующим сравнением полученных нуклеотид-

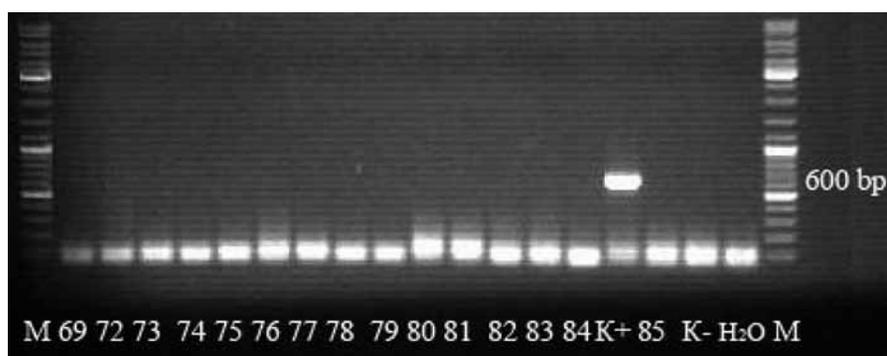


Рис. 5. Электрофореграмма продукта амплификации участка гена *tetB* *T. pallidum*. Показано отсутствие продукта ПЦР для всех исследованных проб и его наличие в пробе K+ — *E. coli* штамм XL1-Blue, являющейся положительным контролем реакции. Цифрами обозначены номера исследованных биообразцов, K- и H₂O — отрицательные контроли (референсная геномная ДНК *T. pallidum* *subsp. pallidum* *str. Nichols* и вода соответственно), M — маркер длин ДНК, 600 bp — расчетный размер продукта амплификации в парах нуклеотидов

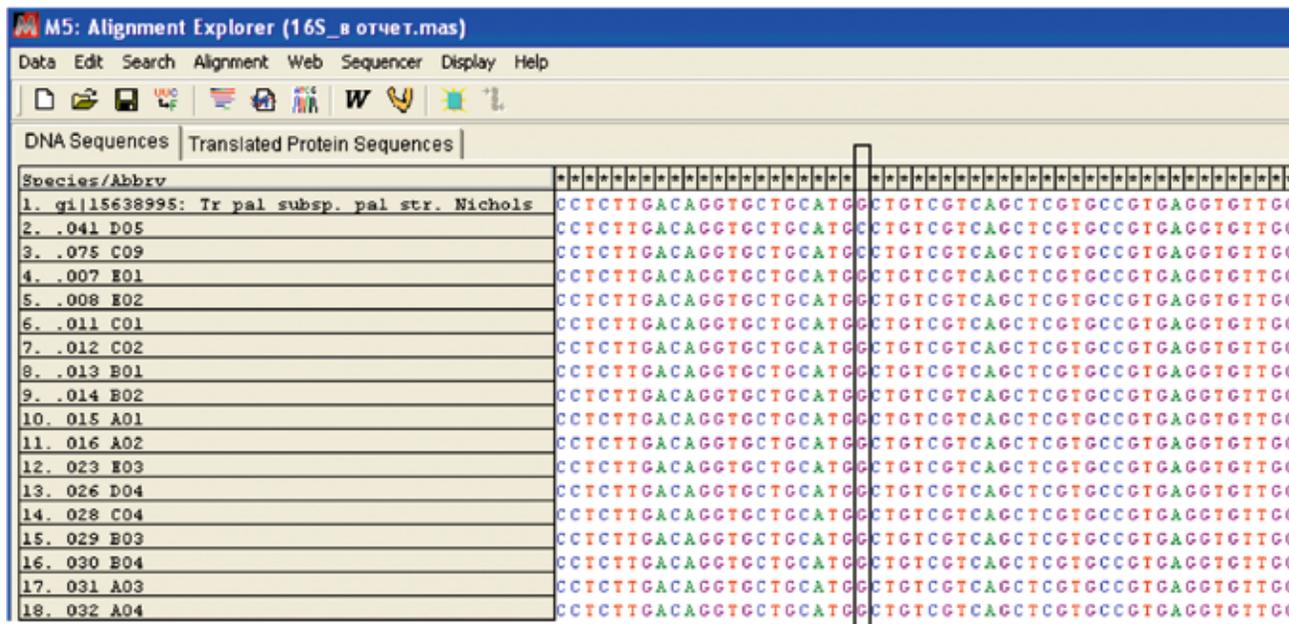


Рис. 6. Фрагмент интерфейса программы Mega5: Alignment Explorer с данными выравнивания последовательностей участка гена, кодирующего 16S рНК *T. pallidum*. Выделен сайт, содержащий нуклеотидную замену в позиции G1058C

ных последовательностей с референсным штаммом *T. pallidum* (*Treponema pallidum* subsp. *pallidum* str. *Nichols chromosome, complete genome* NCBI Reference Sequence: NC_000919.1) с целью выявления возможных различий, влияющих на устойчивость штамма к β-лактамам антибиотикам.

На основании анализа продуктов секвенирования гена *tp47* в большинстве полученных штаммов было обнаружено несоответствие их нуклеотидных последовательностей с референсным штаммом *T. pallidum* str. *Nichols*: в позиции 124 вместо гуанина находился тимин (рис. 7), что приводит к замене в белке Trp47 в



Рис. 7. Фрагмент интерфейса программы Mega5: Alignment Explorer с данными выравнивания последовательностей участка гена *tp47* *T. pallidum*. Выделен сайт, содержащий замену G124T

позиции 394 аминокислоты серина на аргинин. Однако обнаруженная замена не является значимой (мутантный вариант белка *trp47* с делецией D домена в положении 394 демонстрирует уровень β -лактамазной активности на уровне дикого типа) и не может влиять на устойчивость микроорганизма к β -лактамам.

При анализе результатов секвенирования последовательностей гена *Tromp* во всех случаях были обнаружены различия с референсным штаммом *T. pallidum str. Nichols* (база данных NCBI): в позиции 22 вместо цитозина находился гуанин, однако обнаруженная замена не является значимой для функциональной активности белка, так как локализована в области сигнального пептида, необходимого для экспорта белка через цитоплазматическую мембрану.

Таким образом, в результате изучения молекулярных маркеров резистентности *T. pallidum* к β -лактамам антибиотикам был обнаружен ряд замен в генах *Trp47* и *Tromp*, которые, однако, не являются значимыми для функциональной активности белка и не могут влиять на резистентность штаммов *T. pallidum* к β -лактамам.

Заключение

В результате проведенных в ГНЦДК исследований впервые осуществлено молекулярное типирование выборки штаммов *T. pallidum*, циркулирующих на территории Российской Федерации. На основании результатов молекулярного типирования 190 штаммов *T. pallidum* по трем генам (*arp*, *tpr* и *tp0548*) каждому штамму *T. pallidum* был присвоен свой индивидуальный код или тип, состоящий из трех обозначений (цифрового и двух буквенных). Всего было выявлено 10 типов штаммов *T. pallidum*. Доминирующим молекулярным типом среди штаммов *T. pallidum*, обнаруженных на территории Российской Федерации, являлся молекулярный тип 14 (98,4%), подтип 14d/f (91,03%); доля субтипов 14b/f и 14d/T молекулярного типа 14 составила соответственно 3,16 и 2,10%; на долю каждого из остальных субтипов (11d/f, 13d/f, 14a/a, 14a/f, 14d/c, 14d/g и 20d/f) приходилось по 0,53%.

В ходе выполнения научно-исследовательской работы было проведено определение известных

и потенциальных молекулярных маркеров антибиотикорезистентности *T. pallidum* к трем видам антимикробных препаратов: макролидам, тетрациклинам и β -лактамам.

В результате изучения молекулярных маркеров антибиотикорезистентности *T. pallidum* к антибиотикам класса макролидов в трех штаммах *T. pallidum* была обнаружена мутация в позиции 2058 гена, кодирующего 23S rRNA *T. pallidum*, являющаяся молекулярным маркером устойчивости к макролидам.

В двух штаммах *T. pallidum* была обнаружена мутация в позиции 1058 гена, кодирующего 16S rRNA, являющаяся молекулярным маркером резистентности *T. pallidum* к тетрациклинам. Изучение другого маркера резистентности к действию антибиотиков класса тетрациклинов, гена *tetB*, показало наличие детерминанты устойчивости у одного штамма *T. pallidum*.

Резистентность к β -лактамам среди изученных штаммов *T. pallidum* выявлена не была, о чем свидетельствовало отсутствие значимых мутаций в генах *Trp47* и *Tromp*, кодирующих мишени действия β -лактамов.

Штаммы *T. pallidum*, у которых были выявлены мутации, были получены из Приволжского, Сибирского, Центрального и Дальневосточного федеральных округов Российской Федерации.

Проведенное исследование является первым в Российской Федерации опытом молекулярного типирования и определения антибиотикорезистентности штаммов возбудителя сифилиса *Treponema pallidum*. Внедрение методов молекулярной эпидемиологии в систему мониторинга возбудителей инфекций, передаваемых половым путем, способствует установлению закономерностей распространения различных (в том числе резистентных к отдельным антимикробным препаратам и мультирезистентных) штаммов возбудителей между федеральными округами и пограничными с Российской Федерацией государствами, позволяет разрабатывать профилактические меры, направленные на предупреждение распространения таких штаммов и нормализацию эпидемиологической обстановки по заболеваемости инфекциями, передаваемыми половым путем, в Российской Федерации. ■

Литература

1. Pillay A., Liu H., Chen C.Y. et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies *pallidum*. *Sex Transm Dis* 1998; 25: 408—414.
2. Pillay A., Liu H., Ebrahim S. et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* in South Africa: cross-sectional studies. *J Clin Microbiol* 2002; 40: 256—258.
3. Marra C.M., Sahi S.K., Tantalos L.C. et al. Enhanced Molecular Typing of *Treponema pallidum*: Geographical Distribution of Strain Types and Association with Neurosyphilis. *J Infect Dis* 2010; 202 (9): 1380—1388.
4. Peng R.R., Wang A.L., Li J. et al. Molecular Typing of *Treponema pallidum*: A systematic review and meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis*. 2011 (Nov); 5 (11): e1273.
5. Martin I.E., Gu W., Yang Y., Tsang R.S. Macrolide resistance and molecular types of *Treponema pallidum* causing primary syphilis in Shanghai, China. *Clin Infect Dis* 2009; 49: 515—521.
6. Sutton M.Y., Liu H., Steiner B. et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* in an Arizona County with increasing syphilis morbidity: use of specimens from ulcers and blood. *J Infect Dis* 2001; 183: 1601—1606.
7. Martin I.E., Tsang R.S., Sutherland K. et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* strains in western Canada: predominance of 14d subtypes. *Sex Transm Dis* 2010; 37: 544—548.

8. Molepo J., Pillay A., Weber B. et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* strains from patients with neurosyphilis in Pretoria, South Africa. *Sex Transm Infect* 2007; 83: 189—192.
9. Florindo C., Reigado V., Gomes J.P. et al. Molecular typing of *Treponema pallidum* clinical strains from Lisbon, Portugal. *J Clin Microbiol* 2008; 46 (11): 3802—3803.
10. Cole M.J., Chisholm S.A., Palmer H.M. et al. Molecular epidemiology of syphilis in Scotland. *Sex Transm Infect* 2009; 85: 447—451.
11. Приказ Минздрава России № 327 от 25.07.2003 «Об утверждении протокола ведения больных «Сифилис».
12. Duncan W.C. Failure of erythromycin to cure secondary syphilis in a patient infected with the human immunodeficiency virus. *Arch Dermatol* 1989; 125: 82—84.
13. Hashisaki P., Wertzberger G.G., Conrad G.L., Nichols C.R. Erythromycin failure in the treatment of syphilis in a pregnant woman. *Sex Transm Dis* 1983; 10: 36—38.
14. Stamm L.V., Bergen H.L. A point mutation associated with bacterial macrolide resistance is present in both 23S rRNA genes of an erythromycin-resistant *Treponema pallidum* clinical isolate. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44: 806—807.
15. Roberts M.C., Chung W.O., Roe D.E. Characterization of tetracycline and erythromycin resistance determinants in *Treponema denticola*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40 (7): 1690—1694.
16. Roberts M.C. Update on acquired tetracycline resistance genes. *FEMS Microbiol Lett* 2005; 245 (2): 195—203.
17. Norgard M.V., Miller J.N. Plasmid DNA in *Treponema pallidum* (Nichols): potential for antibiotic resistance by syphilis bacteria. *Science* 1981; 213 (4507): 553—555.

об авторах:

А.А. Кубанова — академик РАМН, д.м.н., профессор, директор ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва
 А.А. Кубанов — д.м.н., профессор, заместитель директора ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России по научной работе, Москва
 Н.В. Фриго — д.м.н., заместитель директора ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России по научно-образовательной работе, Москва
 И.А. Волков — к.б.н., старший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и кожных болезней ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва
 С.В. Ротанов — д.м.н., доцент, главный научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и кожных болезней ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва
 А.А. Суворова — младший научный сотрудник отдела лабораторной диагностики ИППП и кожных болезней ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России, Москва