

Генетические детерминанты резистентности к антимикробным препаратам и их распространенность у различных молекулярных субтипов *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*

Образцова О.А.¹, Алейникова К.А.¹, Обухов А.П.², Кубанов А.А.¹, Дерябин Д.Г.¹

¹ ФГБУ «Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии» Минздрава России, Москва, Россия

² Республиканский кожно-венерологический диспансер Республики Тыва, Кызыл, Россия

Контактный адрес:

Дмитрий Геннадьевич Дерябин
Эл. почта: dgderyabin@yandex.ru

Ключевые слова: *Treponema pallidum*, антибиотикорезистентность, генетические детерминанты, молекулярное типирование.

Цель. Исследовать генетические детерминанты устойчивости к антимикробным препаратам, рекомендуемым для терапии сифилиса, с анализом их распространенности у отдельных молекулярных субтипов *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, циркулирующих в Российской Федерации в 2014-2017 гг.

Материалы и методы. В исследование был включен 161 клинический изолят *T. pallidum*, полученный из Республики Тыва, Ставропольского края, Иркутской, Калужской, Новосибирской и Омской областей. Присутствие генетического материала *T. pallidum* подтверждалось методом ПЦР с праймерами к гену *poA*. Поиск детерминант резистентности к пенициллинам (*tromp1*, *tp47*), тетрациклинам (16S рРНК) и макролидам (23S рРНК) проводился по результатам секвенирования перечисленных генов. Молекулярное типирование выполнялось в соответствии с протоколом CDC на основе исследования переменных генов *arp*, *tpr* (*E*, *G*, *J*) и *tp0548*. Результаты исследования были сопоставлены с данными мониторинга антибиотикорезистентности *T. pallidum* в 2011-2012 гг.

Результаты. Анализ нуклеотидных последовательностей генов *tromp1* и *tp47* обнаружил в них замены С22G и G208T соответственно. Указанные полиморфизмы не являлись значимыми для функциональной активности кодируемых белков, но отличали исследованные клинические изоляты от референтного штамма Nichols, связывая их с эпидемически значимой геногруппой *T. pallidum* Street Strain 14. Анализ мутации G1058C в гене 16S рРНК относил к «дикому типу» все клинические изоляты 2014-2017 гг., в то время как в 2011-2012 гг. эта генетическая детерминанта резистентности к тетрациклину была выявлена у 2 из 190 исследованных штаммов. Мутация A2059G/С в гене 23S рРНК также не обнаруживалась, в то время как значимая замена A2058G в этом гене выявлена у 4 изолятов в 2014-2017 гг. Полученные результаты подтверждают сохранение спорадической резистентности к макролидам в Российской Федерации, ранее (в 2011-2012 гг.) обнаруженной у 3 из 190 штаммов *T. pallidum*. Мутация A2058G выявлялась преимущественно у представителей минорных субтипов *T. pallidum* 14 b/f, 14 b/g и 14 d/g, будучи нехарактерной для доминирующего в Российской Федерации молекулярного субтипа 14 d/f.

Выводы. Длительное использование пенициллинов для терапии сифилиса не привело к формированию резистентности *T. pallidum* к данной группе антибиотиков. Отсутствие генетических детерминант резистентности *T. pallidum* к тетрациклину подтверждает их оценку в качестве препаратов резерва, в то время как спорадическая встречаемость детерминант резистентности к макролидам заставляет с осторожностью относиться к их использованию для терапии сифилиса.

Genetic antimicrobial resistance determinants and their prevalence in molecular subtypes of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*

Obraztsova O.A.¹, Aleynikova K.A.¹, Obukhov A.P.², Kubanov A.A.¹, Deryabin D.G.¹

¹ State Scientific Center of Dermatology, Venerology and Cosmetology, Moscow, Russia

² Tyva Republican Dermatovenerologic Dispensary, Kyzyl, Russia

Contacts:

Dmitry G. Deryabin
E-mail: dgderyabin@yandex.ru

Key words: *Treponema pallidum*, antimicrobial resistance, genetic determinants, molecular typing.

Objective. To investigate genetic determinants of resistance to antimicrobial agents recommended for the treatment of syphilis and assess their prevalence in molecular subtypes of *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* in the Russian Federation over the period of 2014-2017.

Materials and methods. A total of 161 clinical isolates of *T. pallidum* obtained from Tyva, Stavropol, Irkutsk, Kaluga, Novosibirsk and Omsk regions were included in this study. Genetic material of *T. pallidum* was detected by PCR with primers to *poA* gene. Determinants of resistance to penicillins (*tromp1*, *tp47*), tetracyclines (16S rRNA) and macrolides (23S rRNA) were determined using the gene sequence analysis. Molecular typing was performed by characterizing variable *arp*, *tpr* (*E*, *G*, *J*) and *tp0548* genes according to the CDC protocol. Results of this study were compared to historical data on antimicrobial resistance of *T. pallidum* over the period of 2011-2012.

Results. Analysis of *tromp1* and *tp47* gene sequences detected C22G and G208T substitutions, respectively. These polymorphisms were not significant for activity of the corresponding proteins, but differed the studied clinical isolates from the reference strain Nichols, therefore, linking them with epidemic genogroup *T. pallidum* Street Strain 14. Based on the analysis of G1058C mutation in the 16S rRNA gene, all clinical isolates obtained in 2014-2017 belonged to wild type, whereas this genetic determinant of resistance to tetracyclines was determined in 2 of 190 isolates obtained in 2011-2012. Also, A2059G/C mutation in the 23S rRNA gene was not found, whereas a significant A2058G substitution in this gene was determined in 4 isolates obtained in 2014-2017. Results of this study confirm sporadic resistance to macrolides in the Russian Federation, which was previously [2011-2012] found in 3 of 190 isolates of *T. pallidum*. A2058G mutation was detected predominantly in minor subtypes of *T. pallidum* (14 b/f, 14 b/g and 14 d/g) and was unrepresentative for molecular subtype 14 d/f which is a predominant one in the Russian Federation.

Conclusions. The long-term use of penicillins for the treatment of syphilis did not result in emergence of *T. pallidum* resistance to this antibiotic class. An absence of genetic determinants of resistance to tetracyclines confirms them to be second-line drugs. A sporadic prevalence of determinants of resistance to macrolides requires they be used for the treatment of syphilis with caution.

Введение

Требования к этиотропной терапии сифилиса определяются международными [1] и национальными [2] клиническими рекомендациями, регламентирующими использование для этой цели нескольких групп лекарственных препаратов. В соответствии с обновленным руководством Всемирной организации здравоохранения [1], основным из них является инъекционный дюрантный пенициллин – дибензилэтилендиаминовая соль бензилпенициллина, в то время как российские клинические рекомендации [2] закрепляют использование дибензилэтилендиаминовой и новокаиновой солей пенициллина в соотношении 4:1, а также указывают на возможность применения других инъекционных пенициллинов – ампициллина и оксациллина. В случае выраженной непереносимости пенициллинов или их клинической недоступности допускается лечение сифилиса с использованием тетрациклинов (доксациклин) [3] или макролидов (эритромицин, азитромицин) [4], а также цефалоспорины III поколения – цефтриаксона [5].

Оценка достоверности доказательств и уровня убедительности подобных рекомендаций традиционно базируется на оценке клинической картины заболевания, негативации серологических реакций, а также результатах фармакокинетических исследований [6, 7], в то время как некультивируемость возбудителя сифилиса – *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* – исключает возможность лабораторного тестирования его антибиотикочувствительности. В то же время развитие молекулярно-генетических методов исследования позволило зафиксировать в геноме *T. pallidum* ряд нуклеотидных полиморфизмов, ассоциированных с развитием устойчивости к антимикробным препаратам и в настоящее время рассматриваемых как новый глобальный вызов системе здравоохранения [8].

Первый опыт молекулярно-генетического тестирования 190 российских клинических изолятов *T. pallidum*, выделенных в 2011-2012 гг. от больных с лабораторно подтвержденными открытыми формами сифилиса, представлен в одной из наших предшествующих публикаций [9]. При этом у единичных штаммов, полученных из Цен-

трального, Сибирского и Приволжского федеральных округов Российской Федерации, были идентифицированы молекулярные маркеры резистентности к тетрациклинам и макролидам, что определило целесообразность продолжения и расширения подобного исследования. Связанной задачей является идентификация основных молекулярных субтипов *T. pallidum* [10], в том числе несущих детерминанты устойчивости к антимикробным препаратам, что призвано сформировать основу для оптимизации эпидемиологического мониторинга сифилитической инфекции.

Целью настоящего исследования было определение генетических детерминант устойчивости к антимикробным препаратам у современных клинических изолятов *Treponema pallidum* subsp. *pallidum*, с анализом их представительства у отдельных молекулярных субтипов возбудителя сифилиса, циркулирующих на территории Российской Федерации в 2014-2017 гг.

Материалы и методы

Материалом для исследования являлся 161 клинический изолят *T. pallidum*, полученный в 2014-2017 гг. из специализированных медицинских учреждений дерматовенерологического профиля Республики Тыва, Ставропольского края, Иркутской, Калужской, Новосибирской и Омской областей (Рисунок 1). Предоставленные биологические образцы представляли собой межтканевую серозную жидкость эрозивных и язвенных элементов сыпи, расположенных на коже и слизистых оболочках больных с клинически и лабораторно подтвержденными открытыми (первичным и вторичным) формами сифилиса. В качестве референтного образца использовался *T. pallidum* subsp. *pallidum* штамм Nichols, культивируемый на тестикулярной модели у кроликов.

Выделение ДНК из исследуемого клинического и лабораторного материала проводилось с использованием набора реагентов «Проба-НК» (ДНК-технология, Россия). Наличие генетического материала *T. pallidum* подтверждалось методом ПЦР с праймерами к гену *polA*

(регион 1156-1531 п.н.), кодирующему специфическую ДНК-полимеразу I данного микроорганизма [11].

Поиск генетических детерминант резистентности к пенициллинам (*tromp1*, *tp47*), тетрациклинам (16S рПНК) и макролидам (23S рПНК) проводили по результатам секвенирования целевых фрагментов названных генов. Их первичная амплификация выполнялась на термоциклере DNA Engine Thermal Cycler (Bio-Rad, США) с использованием праймеров, последовательности которых приведены в Таблице 1. Наличие продуктов амплификации подтверждали электрофорезом в 1% агарозном геле в присутствии бромистого этидия с визуализацией на трансиллюминаторе VersaDoc MP 4000 System (Bio-Rad, США). Полученные ДНК-фрагменты использовали в качестве матриц для повторного цикла амплификации с мечеными терминирующими нуклеотидами Big Dye Terminator v3.1 Sequencing RR-100 (Applied Biosystems,



Рисунок 1. География клинических изолятов *T. pallidum*, полученных из медицинских учреждений дерматовенерологического профиля субъектов Российской Федерации в 2014-2017 гг.

Таблица 1. Последовательности праймеров, использованных для амплификации целевых генов *T. pallidum*

Ген	Название праймера	Нуклеотидная последовательность	Источник
<i>tromp1</i>	<i>tromp1 f</i>	5'-CTGTAGCTGCTTATGC GAGGA-3'	[9]
	<i>tromp1 r</i>	5'-ACGGCTCTTCTACCC ACTCAA-3'	
<i>tp47</i>	<i>tp47 f</i>	5'-CAGACATTCTCGCTC CTCGTAGC-3'	[9]
	<i>tp47 r</i>	5'-GCGCATGGCTCTGA GCATAG-3'	
16S	16S f	5'-ACGCGAACGCATTAA GTGTACCGC-3'	[9]
	16S r	5'-CCCACCTTCTCCGG TTTGTCA-3'	
23S	23S f	5'-GTCTCCACCTATACT ACACAT-3'	[18]
	23S r	5'-GGAGAGGTTCTGG TAACACA-3'	

США). Ампликоны разделяли методом капиллярного электрофореза на приборе 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, США) с использованием программного обеспечения 3730 Data Collection v3.0. Первичную расшифровку нуклеотидных последовательностей проводили в программе Sequencing Analysis 5.3.1. Для выравнивания анализируемых фрагментов целевых генов на референтные последовательности *T. pallidum* использовали программу Mega5.

Молекулярное типирование *T. pallidum* проводилось в соответствии с алгоритмом, рекомендованным Центрами США по контролю и профилактике заболеваний (CDC) для глобального эпидемиологического мониторинга сифилитической инфекции. Данный подход предполагает анализ трех переменных генов *T. pallidum*, а именно: учет количества внутренних нуклеотидных повторов в гене *arp*, определение полиморфизма длин фрагментов рестрикции участка генов подсемейства *tpIII* длиной 1848 п.н., а также исследование нуклеотидной последовательности переменного участка гена *tp0548* (позиции 131-215 п.н.). Метод и порядок оценки его результатов подробно описаны нами ранее [12].

Результаты

Поиск потенциальных детерминант резистентности *T. pallidum* к пенициллинам был проведен в гене *tp47*, кодирующем необычный бифункциональный липопротеин, по-видимому, относящийся к новому классу пенициллинсвязывающих белков [13]. В его структуре присутствуют два различных активных центра: пенициллинсвязывающий и бета-лактамазный [14], активность последнего из которых ведет к превращению пенициллина в пенициллоат, ингибирующий дальнейшую активность Trp47.

Первичная амплификация гена *tp47* у клинических изолятов *T. pallidum* и лабораторного штамма *Nichols* позволила получить ДНК-фрагменты размером около 1,2 тыс. п.н., последующее секвенирование которых выявляло достаточно протяженные нуклеотидные последовательности, хорошо выравниваемые на соответствующий референтный геном (*Treponema pallidum* subsp. *pallidum* strain *Nichols* genome, GenBank: CP010422.1), представленный в базе данных National Center for Biotechnological Information (www.ncbi.nlm.nih.gov). При этом между анализируемыми и референтной последовательностями констатирована чрезвычайно высокая степень гомологии (>99,99%), за исключением единственного нуклеотидного полиморфизма. Так, если в референтном геноме и лабораторном штамме *Nichols* в позиции 208 находился гуанин, то у всех исследованных клинических изолятов выявлена его трансверсия на тимин, что приводило к аминокислотной замене Ala70Ser. Отметим, что существование сходной аминокислотной замены в белке Trp47 описывалось и ранее [9], но тогда осталось без соответствующей интерпретации (см. ниже).

Другим проанализированным геном, также потенциально вовлеченным в развитие устойчивости к пенициллинам, стал *tromp1*, кодирующий локализованный в

наружной мембране *T. pallidum* белок с молекулярной массой 31 кДа и функцией порина [15], участвующий в транспорте молекул антибиотика в периплазматическое пространство. В процессе исследования гена *tomp1* были получены первичные ампликоны размером около 1,2 тыс. п.н., в последующем использованные в реакции с терминирующими нуклеотидами. Сравнение экспериментально определенных последовательностей и последовательности из референтного генома вновь позволило констатировать высокую степень гомологии между ними, за исключением замены C22G, обнаруженной у всех современных клинических изолятов *T. pallidum*. При этом обнаруженная нуклеотидная замена приводила к аминокислотной замене Gln8Glu, оценка значимости которой, как и в случае с геном *tp47*, будет дана нами ниже.

При исследовании устойчивости *T. pallidum* к тетрациклинам было проведено секвенирование участка гена 16S рПНК с акцентом на выявление нуклеотидной замены G1058C в участке связывания антибиотика с малой субъединицей бактериальной рибосомы. При этом направленность подобного поиска дополнительно определялась обнаружением подобной мутации у 2 из 190 клинических изолятов *T. pallidum*, исследованных в 2011-2012 гг. [9]. Однако, в выборке 2014-2017 гг. последовательности генов 16S рПНК у всех исследованных штаммов были отнесены к «дикому типу» с отсутствием искомой или каких-либо иных значимых нуклеотидных замен на участке присоединения аминоацил-тРНК.

Исследование детерминант устойчивости *T. pallidum* к макролидам было проведено в участке гена 23S рПНК, включающем центральную петлю домена V, формирующую пептидил-трансферазный центр большой субъединицы бактериальной рибосомы. Анализ секвенированных последовательностей позволил обнаружить замену A2058G с доказанной ролью в обеспечении высокого уровня резистентности *T. pallidum* к макролидным антибиотикам [16] у 4 из 161 исследованного клинического изолята (Таблица 2). Ранее (в 2011-2012 гг.) данная

Таблица 2. Частота встречаемости генетических детерминант антибиотикорезистентности *T. pallidum* в Российской Федерации в 2011-2012 гг. [9] и 2014-2017 гг.

Гены	Детерминанты резистентности	2011-2012 гг. (n=190)	2014-2017 гг. (n=161)
<i>tomp1</i>	н/з	—*	—*
<i>tp47</i>	н/з	—**	—**
16S	G1058C	2 (1,1%)	—
23S	A2058G	3 (1,6%)	4 (2,5%)
	A2059G/C	—	—

н/з – не значимо.

* обнаружена точечная мутация C22G, не приводящая к формированию устойчивости к пенициллину.

** обнаружена точечная мутация G208T, не приводящая к формированию устойчивости к пенициллину.

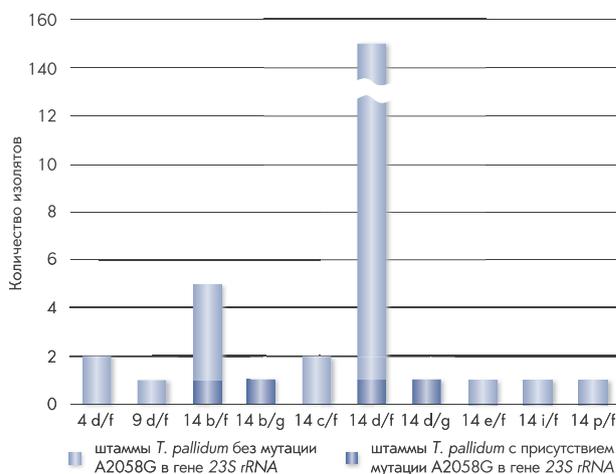


Рисунок 2. Распределение генетических детерминант резистентности к макролидам среди отдельных молекулярных субтипов *T. pallidum*

мутация также была выявлена у 3 из 190 клинических изолятов [9]. С другой стороны, значимой мутации A2059G/C и нуклеотидных замен в положениях 2057, 2452 и 2611, также принимающих участие в формировании устойчивости к макролидам, при проведении настоящего и предшествующего исследований обнаружено не было.

В завершение проведенного исследования было определено представительство обнаруженных маркеров антибиотикорезистентности у основных молекулярных типов *T. pallidum*, циркулирующих на территории Российской Федерации в 2014-2017 гг.

При этом анализ генов *arp*, *tp11* и *tp0548* с присвоением каждому из выявленных вариантов соответствующего цифрового или буквенного обозначения [12] свидетельствовал о присутствии в составе анализируемой выборки 10 молекулярных субтипов, доминирующим из которых являлся 14 d/f (146 из 161 исследованного клинического изолята [90,6%]). Еще 5 штаммов относились к типу 14 b/f (3,1%), а типы 4 d/f и 14 c/f были представлены двумя изолятами каждый (по 1,2%). В свою очередь каждый из остальных 6 субтипов (9 d/f, 14 b/g, 14 e/f, 14 d/g, 14 i/f и 14 p/f) был обнаружен только 1 раз (по 0,6%).

Анализ распространенности нуклеотидной замены A2058G в гене 23S рПНК, определяющей устойчивость к макролидам, показал ее нетипичность для доминирующего субтипа 14 d/f (детерминанта обнаружена у 1 из 146 штаммов данного субтипа) при преимущественном выявлении у минорных молекулярных субтипов *T. pallidum*: 14 b/f, 14 b/g и 14 d/g (Рисунок 2).

Обсуждение результатов

Результаты проведенного исследования позволили констатировать присутствие в геномах современных клинических изолятов *T. pallidum* ряда нуклеотидных замен, которые с различной степенью вероятности определяют резистентность к антимикробным препаратам.

Первым важным наблюдением было обнаружение единичных нуклеотидных замен в генах *tp47* и *tromp1*, кодирующих пенициллиносвязывающий белок (липопротеин) и мембранный порин, вовлеченный в транспорт антибиотика к молекуле-мишени. Однако определяемая трансверсией G208T аминокислотная замена Ala70Ser в белке Trp47 расположена в его домене D, который, по экспериментальным данным, не играет роли в пенициллиносвязывающей или бета-лактамазной активности [13, 14]. Вероятно, незначимой является и аминокислотная замена Gln8Glu в белке Tromp1 (как следствие замены C22G), в связи с ее локализацией в области сигнального пептида, непосредственно не участвующего в транспортной функции этого белка [15]. Вместе с тем, полученные данные позволили по-новому взглянуть на происхождение современных российских штаммов *T. pallidum*, исключив их принадлежность к геногруппе Nichols и, напротив, связав их с представителями геногруппы Street Strain 14, занимающей доминирующее положение в США и некоторых странах ЕС [16]. При этом для представителей геногруппы Street Strain 14 оказываются характерными множественные нуклеотидные замены, наряду с *tp47* и *tromp1* обнаруживаемые и в других генах, в частности, учитываемые в системе молекулярного типирования гена *arp* [16]. Таким образом, описанные при проведении настоящего исследования нуклеотидные полиморфизмы в генах *tp47* и *tromp1* должны оцениваться не как детерминанты антибиотикорезистентности, а как эпидемиологические маркеры, однозначно соотносящие современную российскую популяцию *T. pallidum* с геногруппой Street Strain 14. Эти же данные подтверждают актуальность использования пенициллинов в качестве препаратов выбора при лечении сифилитической инфекции [1, 2], а сходного с ними по структуре и механизму действия цефалоспорина III

поколения, цефтриаксона, в качестве альтернативного препарата для терапии данного заболевания.

Результаты проведенного исследования позволяют сохранить аналогичные рекомендации и для тетрациклинов, что определяется отсутствием у современных российских штаммов *T. pallidum* генетических детерминант резистентности к данной группе antimicrobных препаратов. С другой стороны, результаты исследования заставляют с настороженностью отнестись к рекомендациям по терапии сифилиса с использованием макролидов, что определяется стабильным, хотя и спорадическим, обнаружением клинических изолятов с мутацией A2058G в гене 23S рПНК, обеспечивающей высокий уровень устойчивости *T. pallidum* к данной группе antimicrobных препаратов [16].

Выявление указанных выше детерминант антибиотикорезистентности определило дополнительную задачу анализа их представительства у отдельных молекулярных вариантов возбудителя сифилиса, при решении которой в современной российской популяции *T. pallidum* были идентифицированы 10 субтипов *T. pallidum*. Наиболее многочисленным из них являлся молекулярный тип 14 d/f, устойчивое доминирование которого на территории Российской Федерации показано нами ранее [9]. Однако нуклеотидная замена A2058G в гене 23S рПНК была нетипична для данного субтипа, что может объясняться вспомогательной ролью макролидов в национальных клинических рекомендациях по терапии сифилиса [2]. С другой стороны, эта детерминанта оказалась типичной для минорных субтипов 14 b/f и 14 b/g, а также для субтипа 14 d/g, получившего широкое распространение в США и странах ЕС на фоне широкого использования азитромицина [17]. Указанные обстоятельства позволяют предполагать вероятный трансграничный перенос макролидорезистентных штаммов *T. pallidum*.

Литература

1. WHO Guidelines for the treatment of *Treponema pallidum* (syphilis) [editorial]. 2016. Available at: <http://www.who.int/reproductivehealth/publications/rtis/syphilis-treatment-guidelines/en/>
2. Federal clinical guidelines. Dermatovenerology 2015: Skin diseases. Sexually Transmitted Infections. 5th Ed., M.: Delovoj jekspres, 2016. 768 p. Russian. [Федеральные клинические рекомендации. Дерматовенерология 2015: Болезни кожи. Инфекции, передаваемые половым путем. 5-е изд., перераб. и доп. М.: Деловой экспресс, 2016. 768 с.]
3. Siguier M., Molina J.M. Doxycycline prophylaxis for bacterial sexually transmitted infections: promises and perils. *ACS Infectious Diseases*. 2018;4(5):660-663.
4. Yang C.J., Tang H.J., Chang S.Y., et al. Comparison of serological responses to single-dose azithromycin (2 g) versus benzathine penicillin G in the treatment of early syphilis in HIV-infected patients in an area of low prevalence of macrolide-resistant *Treponema pallidum* infection. *J Antimicrob Chemother*. 2016;71(3):775-782.
5. Yuping Cao, Xiaohong Su, Qianqiu Wang, et al. A multicenter study evaluating ceftriaxone and benzathine penicillin G as treatment agents for early syphilis in Jiangsu, China. *Clin Infect Dis*. 2017;65(10):1683-1688.
6. Chia-Jui Yang, Nan-Yao Lee, Tun-Chieh Chen, et al. One dose versus three weekly doses of benzathine penicillin G for patients co-infected with HIV and early syphilis: a multicenter, prospective observational study. *PLoS One*. 2014;9(10):e109667.
7. Blencowe H., Cousens S., Kamb M., Berman S., Lawn J.E. Lives saved tool supplement detection and treatment of syphilis in pregnancy to reduce syphilis related stillbirths and neonatal mortality. *BMC Public Health*. 2011;11(Suppl 3):S9.
8. Stamm L.V. Global Challenge of Antibiotic-Resistant *Treponema pallidum*. *Antimicrob Agents Chemother*. 2010;54(2):583-589.
9. Kubanova A.A., Kubanov A.A., Frigo N.V., et al. First experience of molecular typing and determining the antibiotic resistance of syphilis pathogen *Treponema pallidum* in the Russian Federation. *Vestnik dermatologii i venerologii*. 2013;(3):34-46. Russian. [Кубанова А.А., Кубанов А.А., Фриго Н.В. и соавт. Первый опыт молекулярного типирования и определения антибиотикорезистентности штаммов возбудителя сифилиса *Treponema pallidum* в Российской Федерации. *Вестник дерматологии и венерологии*. 2013;(3):34-46.]
10. Pillay A., Liu H., Chen C.Y., et al. Molecular subtyping of *Treponema pallidum* subspecies pallidum. *Sex Transm Dis*. 1998;25(8):408-414.
11. Pope V., Fox K., Liu H., et al. Molecular Subtyping of *Treponema pallidum* from North and South Carolina. *J Clin Microbiol*. 2005;43(8):3743-3746.

12. Kubanov A.A., Vorob'ev D.V., Obratsova O.A., Deryabin D.G., Obukhov A.P. Molecular epidemiology of *Treponema pallidum* in a Frontier region of the Russian Federation (Tuva Republic). *Molekuljarnaja genetika, mikrobiologija i virusologija*. 2017;35(1):26-30. Russian. (Кубанов А.А., Воробьев Д.В., Обухов А.П., Образцова О.А., Дерябин Д.Г. Молекулярная эпидемиология *Treponema pallidum* в приграничном регионе Российской Федерации (Республика Тыва). *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*. 2017;35(1):26-30.).
13. Deka R.K., Machius M., Norgard M.V., Tomchick D.R. Crystal structure of the 47-kDa lipoprotein of *Treponema pallidum* reveals a novel penicillin-binding protein. *J Biol Chem*. 2002;277:41857-41864.
14. Goffin C., Ghuysen J.M. Multimodular penicillin-binding proteins: an enigmatic family of orthologs and paralogs. *Microbiol Mol Biol Rev*. 1998;62(4):1079-1093.
15. Blanco D.R., Champion C., Exner M.M., et al. Porin activity and sequence analysis of a 31-kilodalton *Treponema pallidum* subsp. *pallidum* rare outer membrane protein (Tromp1). *J Bacteriol*. 1995;177(12):3556-3562.
16. Matejková P., Strouhal M., Smajs D., et al. Complete genome sequence of *Treponema pallidum* ssp. *pallidum* strain SS14 determined with oligonucleotide arrays. *BMC Microbiol*. 2008;8:76.
17. Grimes M., Sahi S.K., Gdornes B.C., et al. Two mutations associated with macrolide resistance in *Treponema pallidum*: increasing prevalence and correlation with molecular strain type in Seattle, Washington. *Sex Transm Dis*. 2012;39(12):954-958.
18. Lee S.Y., Ning Y., Fenno J.C. 23S rRNA point mutation associated with erythromycin resistance in *Treponema denticola*. *FEMS Microbiol Lett*. 2002;207(1):39-42.