

**МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ'Я УКРАЇНИ  
ВІННИЦЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ  
ім. М. І. ПИРОГОВА**

**БОЙКО ІРИНА БОРИСІВНА**

**УДК 616.98:576.851.232:615.33.015.8]-078(477)**

**МІКРОБІОЛОГІЧНА ДІАГНОСТИКА ГОНОКОКОВОЇ ІНФЕКЦІЇ,  
АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНІСТЬ ТА ГЕНОМНА ЕПІДЕМІОЛОГІЯ  
*NEISSERIA GONORRHOEAE* В УКРАЇНІ**

**03.00.07 – мікробіологія**

**АВТОРЕФЕРАТ  
дисертації на здобуття наукового ступеня  
кандидата медичних наук**

**Вінниця – 2021**

Дисертацією є рукопис.

Робота виконана у Тернопільському національному медичному університеті імені І. Я. Горбачевського МОЗ України.

**Науковий керівник:** доктор філософії, професор, **Магнус Унемо**, директор центру співробітництва ВООЗ з питань гонореї та інших інфекцій, які передаються статевим шляхом, відділення лабораторної медицини та клінічної мікробіології Університетської лікарні м. Орebro (Швеція).

**Офіційні опоненти:**

- доктор медичних наук, професор **Корнійчук Олена Петрівна**, Львівський національний медичний університет імені Данила Галицького МОЗ України, завідувач кафедри мікробіології;
- доктор медичних наук, професор **Нагайчук Василь Іванович**, Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова МОЗ України, професор кафедри загальної хірургії.

Захист дисертації відбудеться «18», березня 2021 р. о 11<sup>00</sup> годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 05.600.05 Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова МОЗ України за адресою: 21018, Україна, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56.

З дисертацією можна ознайомитись у бібліотеці Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова МОЗ України за адресою: 21018, Україна, м. Вінниця, вул. Пирогова, 56.

Автореферат розісланий «12» лютого 2021 р.

**Вчений секретар  
спеціалізованої вченої ради,  
доктор медичних наук, доцент**

**О. А. Назарчук**

## ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

**Актуальність теми.** Гонококова інфекція (ГІ), викликана грамнегативними диплококами виду *Neisseria gonorrhoeae*, є другою найпоширенішою у світі бактеріальною інфекцією, яка передається статевим шляхом (ІПСШ) (R. D. Kirkcaldy et al., 2019; J. Rowley et al., 2019). Нелікована ГІ зумовлює тяжкі ускладнення у чоловіків і жінок репродуктивного та працездатного віку, в тому числі непліддя. Існує високий ризик інтранатального інфікування новонародженої дитини із розвитком гонококового кон'юнктивіту та, за відсутності лікування, сліпоти. Крім того, *N. gonorrhoeae* є вагомим фактором ризику щодо інфікування й подальшого передавання ВІЛ-інфекції (B. Brooks et al., 2013; M. Unemo et al., 2019).

Всесвітня організація охорони здоров'я (ВООЗ) повідомила про 86,9 млн випадків ГІ серед дорослого населення планети у 2016 р. (J. Rowley et al., 2019). Показники захворюваності на ГІ зросли у 1,5 рази (з 17,1 до 26,4 на 100 тис. населення) у країнах Європейського союзу та Європейської економічної зони за період 2000–2018 рр., що пов'язано зі зростанням інфекційної захворюваності та із широким застосуванням в мікробіологічній діагностиці високочутливих та специфічних методів ампліфікації нуклеїнових кислот (МАНК) (K. A. Workowski et al., 2015; P. J. Horner et al., 2016; J. Sherrard et al., 2018). Водночас в Україні даний показник знизився у 5,5 рази – з 52,9 до 9,7 на 100 тис. населення, що пояснюють неповною офіційною реєстрацією випадків ГІ, використанням низькочутливих та низькоспецифічних методів для скринінгу і діагностики, а також самолікуванням інфікованих осіб в умовах широкої безрецептурної доступності антибактеріальних препаратів (В. М. Заболотько, 2019; Г. І. Мавров та ін., 2005; В. М. Волкославська, 2015; Г. М. Бондаренко та ін., 2017; В. Н. Кравченко та ін., 2018).

Особливостями сучасного перебігу ГІ є малосимптомність або безсимптомність, а також набуття гонококами антибіотикорезистентності (АБР) до майже всіх груп антибіотиків, які запровадили в схемах лікування ГІ (J.J. Ong, et al., 2019; D. Golparian, et al., 2020). Резистентність гонококів зареєстрована в тому числі й до цефалоспоринів широкого спектру дії (ЦШСД) та азитроміцину – сучасної та, на даний час, єдиної рекомендованої комбінації антибіотиків для емпіричного лікування ГІ, яку більшість країн використовують як спосіб подвійної терапії (C. Bignell et al., 2012; V. Romanowski et al., 2013; K. A. Workowski, 2015; E. Hiltunen-Back, 2017). Це вкрай ускладнює менеджмент ГІ та значно сприяє подальшому поширенню й персистенції інфекції в популяції (B. Brooks et al., 2013).

На тлі розвитку АБР гонококів, контроль за ГІ суттєво залежить від раннього виявлення інфікованих осіб та їхніх статевих партнерів за допомогою високочутливих і високоспецифічних із гарантованою якістю методів мікробіологічної діагностики, а також вчасного та ефективного лікування. У відповідь на розвиток АБР гонококів багато країн у світі впровадили національні програми спостереження, в тому числі із залученням методів молекулярної та геномної епідеміології (J. Gratrix et al., 2018; S. R. Harris et al., 2018; M. J. Cole et al., 2019).

Дотепер в Україні не затверджено національної програми щодо спостереження за АБР гонококів, а для емпіричного лікування ГІ використовують низку антибіотиків. Все вищевикладене зумовило актуальність даного дослідження.

**Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами.** Дисертаційна робота виконана згідно з планом наукових досліджень комплексної науково-дослідної програми кафедри мікробіології, вірусології та імунології Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України «Моніторинг антибіотикорезистентних штамів при соматичній та інфекційній патології у осіб різного віку» (№ державної реєстрації 0119U000168). Тема і план дисертації затверджено вченою радою Тернопільського національного медичного університету ім. І. Я. Горбачевського МОЗ України (протокол № 19 від 24.06.2015 р. та № 16 від 24.12.2019 р.). Дослідження було підтримане грантами Комітету з досліджень ради округу Оребро та Фонду медичних досліджень при Університетській лікарні м. Оребро (Швеція).

**Мета** – оптимізація мікробіологічної діагностики гонококової інфекції для дослідження антибіотикорезистентності й геномної епідеміології *N. gonorrhoeae* в Україні.

**Завдання дослідження:**

1. Провести аналіз мікробіологічних методів діагностики гонококової інфекції в обласних шкірно-венерологічних диспансерах відповідно до рекомендацій ВООЗ.
2. Визначити аналітичні характеристики стандартних методів діагностики гонококової інфекції в Україні.
3. З'ясувати епідеміологічний профіль пацієнтів з гонококовою інфекцією та застосовану антибіотикотерапію.
4. Дослідити антибіотикорезистентність ізолятів *N. gonorrhoeae*, виділених в Україні.
5. Охарактеризувати генетичні механізми антибіотикорезистентності *N. gonorrhoeae*.
6. Описати геномну епідеміологію ізолятів *N. gonorrhoeae* в Україні.

**Об'єкт дослідження:** гонококова інфекція.

**Предмет дослідження:** мікробіологічна діагностика ГІ, аналітичні характеристики мікробіологічних методів діагностики ГІ, епідеміологія ГІ, мінімальна інгібуюча концентрація (МІК, мг/л) антибіотиків до ізолятів *N. gonorrhoeae*, продукція β-лактамази ізолятами *N. gonorrhoeae*, геноми ізолятів *N. gonorrhoeae*.

**Методи дослідження:** бібліосемантичний (вивчення фахової сучасної міжнародної літератури з досліджуваної проблеми), соціологічний (проведення анкетувань), мікробіологічні (мікроскопічний метод із забарвленням урогенітального матеріалу метиленовим синім і за Грамом; виділення гонококів у культурах, швидкий тест на продукцію ізолятами *N. gonorrhoeae* цитохром С-оксидази; швидкий тест утилізації цукрів; час-пролітний мас-спектрометричний аналіз за типом матрикс-асоційованої спектрометрії часу прольоту десорбованих лазером іонізованих мас; Е-тест для визначення МІК антибіотиків; нітроцефіновий тест на визначення продукції β-лактамази), молекулярно-біологічні (МАНК), геномні (повне секвенування геному (ПСГ) ізолятів *N. gonorrhoeae*), математично-статистично-біоінформативні.

**Наукова новизна одержаних результатів.** Дисертаційна робота містить нові

дані для розв'язання наукової задачі, що стосується АБР та геномної епідеміології гонококів в Україні.

Уперше, за допомогою міжнародних стандартизованих методів ВООЗ, визначено антибіотикочутливість ізолятів гонококів, які циркулювали у 2013–2018 рр. у Тернопільській та Дніпропетровській областях. Отримані результати дали змогу вперше включити дані про АБР гонококів із України до Глобальної програми ВООЗ щодо спостереження за АБР гонококів.

Уперше досліджено геномну епідеміологію гонококів в Україні з використанням ПСГ, визначення молекулярно-епідеміологічних секвенс-типів (ST) та вивчення генетичних детермінант АБР. Було охарактеризовано 30 нових NG-MAST (*N. gonorrhoeae* multi-antigen sequence typing, мультиантигенне типування послідовностей *N. gonorrhoeae*) ST, 17 нових NG-STAR (*N. gonorrhoeae* sequence typing for antimicrobial resistance, типування послідовностей *N. gonorrhoeae* щодо резистентності до антибіотиків) ST та 7 нових MLST (multi-locus sequence typing, мультилокусне типування послідовностей) ST. Усі зчитування послідовностей ПСГ ізолятів гонококів з України доступні у Європейському нуклеотидному архіві (European Nucleotide Archive, ENA; PRJEB36606).

Уперше в Україні за допомогою високочутливих та високоспецифічних референтних молекулярних тестів Artima Combo 2 (тести Artima), затверджених FDA (Управління із санітарного нагляду за якістю харчових продуктів та медикаментів, США), було встановлено надійний, якісно контрольований та епідеміологічно значущий (1,5 %) рівень поширеності ГІ серед дорослих осіб із симптомами уrogenітальних інфекцій у Тернопільській області.

Набуло подальшого розвитку дослідження аналітичних характеристик стандартних методів діагностики ГІ в Україні шляхом визначення субоптимальної чутливості мікроскопічного методу із забарвленням уrogenітального матеріалу метиленовим синім і за Грамом (71,4 %) та культурального методу виділення *N. gonorrhoeae* (57,1 %).

**Практичне значення одержаних результатів.** Отримані результати суттєво впливають на розвиток рутинної та молекулярної епідеміології ГІ в Україні, а також поглиблюють знання про механізми розповсюдження гонококів у межах України та їхні зв'язки з популяцією гонококів, поширених в інших країнах. Разом із цим отримані дані про фенотипові й геномні характеристики ізолятів гонококів, які циркулювали у Тернопільській та Дніпропетровській областях, дали змогу запропонувати антибіотики для першої лінії емпіричного лікування ГІ (цефтріаксон, азитроміцин, спектиноміцин), а також й ті, що слід взагалі вилучити зі схем лікування (ципрофлоксацин, тетрациклін, бензилпеніцилін). Представлені у роботі дані субоптимальних аналітичних характеристик стандартних методів діагностики ГІ є підґрунтям для невідкладного широкого впровадження валідованих та якісно гарантованих молекулярних аналізів ДНК гонококів в Україні. Оптимізована, валідована та якісно контрольована операційна процедура виділення *N. gonorrhoeae* культуральним методом із використанням непоживного транспортно-Зо середовища агарового гелю Amies з вугіллям і селективного шоколадного агару була впроваджена в практичну діяльність лабораторії Комунальної установи Тернопільської обласної ради «Тернопільський обласний клінічний шкірно-венерологічний диспансер»

(ТОКШВД) та може також використовуватись у практиці інших бактеріологічних лабораторій в Україні та світі. Запровадила в практику ТОКШВД методологію забору клінічного матеріалу для молекулярно-біологічного методу дослідження ГП та методологію одержання ізолятів *N. gonorrhoeae* для їх наступної молекулярно-генетичної ідентифікації, дослідження АБР відповідно до міжнародних стандартів ВООЗ щодо мікробіологічної діагностики ГП.

Результати дослідження впроваджено у науковий та навчальний процес кафедри мікробіології, вірусології та імунології та кафедри функціональної й лабораторної діагностики Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України; кафедри мікробіології, вірусології та імунології Запорізького державного медичного університету; кафедри шкірних та венеричних хвороб Вінницького національного медичного університету ім. М. І. Пирогова МОЗ України; а також у клініко-діагностичний процес лабораторії мікробіології та відділу інфекцій, які передаються статевим шляхом Державної установи «Інститут дерматології та венерології національної медичної академії наук України», поліклінічного відділу комунального підприємства «Обласний шкірно-венерологічний диспансер» Дніпропетровської обласної ради, комунального підприємства «Рівненський обласний шкірно-венерологічний диспансер» Рівненської обласної ради, бактеріологічного відділу клініко-діагностичної лабораторії Комунального некомерційного підприємства «Херсонський обласний шкірно-венерологічний диспансер» Херсонської обласної ради.

**Особистий внесок здобувача.** Особисто провела інформаційно-патентний пошук та аналіз літературних джерел; розробила анкету для оцінювання можливостей мікробіологічної діагностики ГП в ОШВД України; виконала валідаційні аналітичні дослідження культурального методу діагностики ГП, оптимізувала операційну процедуру виділення *N. gonorrhoeae* культуральним методом й впровадила її в практику ТОКШВД; виконала забір клінічного матеріалу від хворих для молекулярно-біологічного методу дослідження ГП відповідно до міжнародних стандартів ВООЗ; виділила ізоляти *N. gonorrhoeae* для їх наступної молекулярно-генетичної ідентифікації та дослідження АБР відповідно до міжнародних стандартів ВООЗ; провела мікробіологічні дослідження біологічних властивостей ізолятів *N. gonorrhoeae*, нітроцефіновий тест, E-тест, MALDI-TOF MS; здійснила статистичний і науковий аналіз отриманих даних, написала всі розділи дисертації.

Окреслення завдань, інтерпретацію результатів, формування висновків та практичних рекомендацій дисертації здійснено разом із науковим керівником. Визначення концепції дослідження, теоретичне обґрунтування роботи, методичне консультування, курацію виконання роботи здійснив науковий керівник.

Мікробіологічні, молекулярні та геномні дослідження на базі центру співробітництва ВООЗ з питань гонореї та інших інфекцій, які передаються статевим шляхом, відділення лабораторної медицини та клінічної мікробіології Університетської лікарні м. Орєбро (Швеція) здійснено за безпосередньої участі здобувача. Публікації за темою дисертації оригінальні. З наукових праць, опублікованих у співавторстві, у дисертації використано лише ті ідеї, положення й висновки, які є результатом особистої роботи здобувача та становлять її індивідуальний внесок. Персональний внесок дисертанта наводиться в дисертації,

авторефераті в списку опублікованих праць. Конфлікту інтересів немає.

**Апробація результатів дисертації.** Основні наукові положення, висновки та практичні рекомендації дисертаційної роботи оприлюднено на науково-практичній конференції (НПК) з міжнародною участю «Дерматовенерологія в розробках молодих учених» (Київ, 2015 р.); НПК «Менеджмент надання спеціалізованої медичної допомоги при інфекціях, які передаються статевим шляхом» (Тернопіль, 2015 р.); всеукраїнській НПК Української асоціації лікарів-дерматовенерологів і косметологів із міжнародною участю «Сучасні підходи до формування клінічних настанов із діагностики та лікування шкірних захворювань й інфекцій, що передаються статевим шляхом: європейський досвід і всеукраїнські реалії» (Тернопіль, 2016 р.); світовому та європейському конгресі Міжнародної спілки проти інфекцій, які передаються статевим шляхом (Дублін, Ірландія, 2018 р.); НПК з міжнародною участю «Питання профілактики, сучасна діагностика та інноваційні методи терапії в дерматовенерології» (Харків, 2018 р.); 33-му європейському конгресі Міжнародної спілки проти інфекцій, які передаються статевим шляхом (Таллінн, Естонія, 2019 р.).

**Публікації.** За матеріалами дисертації опубліковано 11 наукових праць, у тому числі 6 статей оригінальних досліджень, з яких 1 – у міжнародному виданні першого квартилю та 4 – у міжнародних виданнях другого квартилю відповідно до класифікації SCImago Journal and Country Rank та проіндексованих у базах даних Web of Science Collection та Scopus, 1 – у фаховому державному виданні, рекомендованому МОН України, 5 тез доповідей у матеріалах НПК та конгресів (2 – у міжнародних (світових та європейських) конгресах).

**Обсяг та структура дисертації.** Дисертація викладена українською мовою на 222 сторінках друкованого тексту (основний текст дисертації на 137 сторінках) та містить вступ, огляд літератури, опис матеріалів і методів досліджень, чотири розділи власних досліджень, аналіз й узагальнення результатів, висновки, практичні рекомендації, список використаних джерел, який нараховує 231 джерело (24 кирилицею та 207 латиницею), додатки. Робота ілюстрована 23 рисунками та 36 таблицями.

## ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

У вступі обґрунтовано актуальність обраної теми, сформовані мета та завдання дослідження, визначено зв'язок роботи з державними науковими програмами, розкрито наукову та практичну цінність одержаних результатів, наведено дані щодо апробації дослідження, вказано обсяг і структуру дисертації.

**Огляд літератури** містить аналіз сучасних наукових джерел літератури, висвітлення проблеми розвитку АБР *N. gonorrhoeae*, наведені методи мікробіологічної діагностики ГІ, питання епідеміології та заходи зі спостереження за розвитком АБР гонококів. Висвітлено важливе місце мікробіологічної діагностики ГІ в отриманні живих ізолятів *N. gonorrhoeae* для вивчення АБР та геномної епідеміології гонококів. Наголошено, що дані про чутливість гонококів до антибіотиків є основою для систематичного перегляду національних настанов із лікування ГІ.

**Матеріали та методи дослідження.** Аналіз стану мікробіологічної

діагностики ГІ в Україні здійснено за допомогою двох серій анкетних досліджень. Перше анкетування було проведено серед обласних шкірно-венерологічних диспансерів (ОШВД) України (n=14) за період із січня 2013 р. до вересня 2014 р.. Друге анкетування «ЕССГ 2018 Questionnaire (Gonorrhoea)» було проведене Європейською спільною клінічною групою Міжнародної спілки проти ІПСШ у період 2018–2019 рр. та включало опитування серед експертів із України (n=2) разом із даними 76 експертів із 22 інших країн Європейського регіону ВООЗ.

Порівняльні дослідження поживних середовищ та способів посіву біологічного матеріалу для виділення гонококів культуральним методом, вивчення умов життєздатності *N. gonorrhoeae* за зберігання у непоживному транспортному середовищі агарового гелю Amies з вугіллям та валідаційне дослідження оптимізованої стандартної операційної процедури виділення *N. gonorrhoeae* культуральним методом проводили із використанням 47, 46, 46 та 141 клінічних ізолятів *N. gonorrhoeae* відповідно.

Епідеміологічний профіль пацієнтів із діагностованою ГІ та застосовану антибіотикотерапію ГІ з'ясовано за участі 136 та 131 пацієнтів відповідно. Поширеність ГІ серед дорослих пацієнтів ТОКШВД із симптомами уrogenітальних інфекцій (n=455) та аналітичні характеристики мікроскопічного методу із забарвленням уrogenітального матеріалу метиленовим синім і за Грамом (n=455) і культурального методу (n=43) діагностики ГІ визначали за допомогою міжнародних референтних молекулярних тестів Artima Combo 2 (Hologic Inc., Сан Дієго, США). Усі тести Artima проводили з використанням платформи Panther System Gen-Probe (Hologic Inc., Сан Дієго, США).

Клінічні ізоляти гонококів ідентифікували з застосуванням швидкого тесту на продукцію оксидази OXItest (Mikrolatest, Erba Lachema s.r.o., Брно, Чеська Республіка), швидкого тесту утилізації цукрів Neisseria-test (PLIVA-Lachema Diagnostika s.r.o., Брно, Чеська Республіка), MALDI-TOF MS (Microflex LT, Bruker Daltonik, Бремен, Німеччина), Cerheid Xpert CT/NG тесту (Cerheid Inc., Каліфорнія, Сонівейл, США).

Визначення чутливості до антибіотиків (цефіксиму, цефтріаксону, бензилпеніциліну, гентаміцину, тетрацикліну, азитроміцину, спектиноміцину і ципрофлоксацину) проводили для всіх 150 ізолятів гонококів за допомогою E-тесту (bioMérieux, Марсу-л'Étoile, Франція). Результати МІК антибіотиків інтерпретували відповідно до рекомендацій Європейського комітету з визначення чутливості до антимікробних препаратів (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing breakpoints, EUCAST). Епідеміологічні точки відсікання (Epidemiological cut-off values) EUCAST використали для визначення резистентності азитроміцину за МІК > 1 мг/л (EUCAST, 2020). Для інтерпретації чутливості до гентаміцину використовували раніше опубліковані критерії (M. Bala et al., 2016; L. V. Brown et al., 2010; L. M. Mann et al., 2018). Продукцію β-лактамази визначали за допомогою нітроцефінового тесту Oxoid Limited, (Basingstoke, Гемпшир, Сполучене королівство). Референс-штами колекцій 2008 ВООЗ *N. gonorrhoeae* та 2016 ВООЗ *N. gonorrhoeae* використали для контролю якості всіх фенотипових характеристик ізолятів *N. gonorrhoeae*. (M. Unemo et al., 2009; M. Unemo et al., 2016; F. E. El-Rami et al., 2019). Епідеміологічно значуща частка резистентних ізолятів



гонококів до певного антибіотику була прийнята за 5 % відповідно до рекомендацій ВООЗ (J. Tapsall et al., 2001; T. Wi et al., 2017; M. J. Cole et al., 2019).

Геномні ДНК ізолятів гонококів виділяли з використанням QIAasympyphony DSP Virus/Pathogen MidiKit (Qiagen GmbH, Гільден, Німеччина). ПСГ виконали для всіх 150 ізолятів за допомогою Nextera XT DNA library preparation kit та Illumina MiSeq Platform (Illumina, Inc., Сан - Дієго, Каліфорнія, США). Генетичні детермінанти АБР, зокрема *penA*, *mtrR*, *penB* (*porB1b* мутації), *ponA*, *gyrA*, *parC* та *rpsJ*, виявляли за допомогою реконструкції *de novo*, заснованій на *in silico*. Частоту мутацій, які визначають резистентність до макролідів (A2059G, C2611T) у ділянці пептидотрансферази домену V гена *23S rRNA*, та мутації генів, що відповідають за АБР до спектиноміцину (*16S rRNA* та *5S rRNA*), ідентифікували з використанням CLC Genomic Workbench software v.9.5.5 (CLC bio, Qiagen). Алелі MLST, NG - STAR і NG-MAST для всіх ізолятів визначали *in silico* з використанням CLC Genomic Workbench та NG-MASTER (J. Tapsall et al., 2009). Дані баз MLST (<https://pubmlst.org/neisseria/>), NG-MAST (<http://www.ng-mast.net/>) і NG-STAR (<https://ngstar.canada.ca/pages/welcome?lang=en>) використовували для призначення номерів алелей та ST (W. Demczuk et al., 2017). Читання результатів для всіх ізолятів зіставляли з хромосоною *N. gonorrhoeae* референс-штаму ВООЗ F (M. Unemo et al., 2016; W. Demczuk et al., 2017). Дендрограму максимальної ймовірності відтворювали з групування всього геному за допомогою RAxML (версія 8, Scientific Computing Group, Гейдельберг, Німеччина) (A. Stamatakis et al., 2014). Філогеномічні клейди визначали на основі генетичних відстаней у філогенетичному дереві за допомогою інструменту RAMI (S. Jacobsson et al., 2016). Платформу візуалізації та відстеження епідемій у реальному часі із загальним доступом Microreact (Центр спостереження за геномним патогеном, Кембриджшир, Сполучене Королівство, <https://microreact.org>) використали для візуалізації геномної епідеміології і філогеографії з демонстрацією спорідненості ізолятів (S. Argimón et al., 2016).

Наукову роботу виконували з дотриманням заходів безпеки відповідно з морально етичними нормами та принципами Гельсінської декларації ухвалені Генеральною Асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації; Конвенції Ради Європи про права людини і біомедицину; законів України, наказів Міністерства охорони здоров'я України (протокол № 56 засідання комітету з біоетики Тернопільського національного медичного університету імені І. Я. Горбачевського МОЗ України від 08.01.2020 р.).

Статистичний аналіз отриманих результатів проводили за допомогою універсальних статистичних програм в пакеті Microsoft® Excel® 2016 MSO, програмного забезпечення MedCalc Statistical Software version 19.11.3 (MedCalc Software bvba, Остенде, Бельгія). Визначали показник частоти виникнення певної ознаки в досліджуваній вибірці, межі довірчого інтервалу із рівнем довіри 95 % (95 % ДІ), середнє арифметичне значення та його стандартне відхилення; медіану, міжквартильний діапазон. Імовірність різниці значень між незалежними величинами визначали за допомогою критерію  $\chi^2$  з корекцією n-1 (якщо обсяг вибірки був достатнім), або тесту Фішера (за малого обсягу вибірки) (I. Campbell, 2007; J.T. Richardson, 2011). Вірогідними вважали відмінності за  $p < 0,05$ .

**Результати досліджень та їх обговорення.** З'ясовано, що стан

мікробіологічної діагностики ГІ у ОШВД України не відповідав рекомендаціям ВООЗ. Зокрема, лабораторії диспансерів не застосовували методу ампліфікації нуклеїнових кислот у період 2013–2014 рр. Біохімічна ідентифікація одержаних культур була доступною у 75 % (9/12) бактеріологічних підрозділів ОШВД. У більшості (85,7 %, 12/14) респондентів не визначали чутливості / антибіотикорезистентності *N. gonorrhoeae* (табл. 1). Зовнішній контроль якості мікробіологічних досліджень діагностики ГІ здійснювали у 50 % [95 % ДІ: 21,1–78,9] (6/12) опитаних.

Таблиця 1

Обсяг застосованих мікробіологічних методів діагностики гонококової інфекції в ОШВД України у 2013–2014 роках

Методи мікробіологічної діагностики		Кількість ОШВД		
		n/N	%	[95 % ДІ]
Методи дослідження клінічного матеріалу	мікроскопічний	14/14	100	[76,8–100]
	культуральний	12/14	85,7	[57,2–98,2]
	швидкі тести	1/14	7,1	[0,2–33,8]
	МАНК	0/14	0,0	[0,0–23,2]
Методи ідентифікації одержаних культур	мікроскопічний	12/12	100	[73,5–100]
	оксидазний тест	12/12	100	[73,5–100]
	біохімічний	9/12	75,0	[42,8–94,5]
Одержання ізолятів гонококів та вивчення їх АБР		2/14	14,3	[1,8–42,8]

Примітка. ОШВД – обласний шкірно-венерологічний диспансер; МАНК – метод ампліфікації нуклеїнових кислот; АБР – антибіотикорезистентність; 95 % ДІ – межі довірчого інтервалу 95 %; n – абсолютні значення перемінної ознаки у досліджуваній вибірці; N – абсолютні значення досліджуваної вибірки.

Результати європейського анкетування серед національних експертів стосовно мікробіологічних методів діагностики ГІ, проведеного Європейською спільною клінічною групою Міжнародного союзу з ІПСШ, показали, що доступ до МАНК та виконання тестів на антибіотикочутливість гонококів в Україні залишався частковим (50 %, 1/2) у 2018–2019 рр..

При порівняльному дослідженні поживних середовищ встановлено, що селективний шоколадний агар<sup>TM</sup>+PolyViteX VCAT3 (bioMérieux, Marcy-l'Étoile, Франція) демонстрував вищі ростові властивості, забезпечуючи високу частоту виділення клінічних ізолятів *N. gonorrhoeae* (91,5 %,  $p < 0,0001$ ) порівняно до селективного набору для виділення гонококів культуральним методом (СВГ) (Федеральний бюджетний заклад науки НДІ епідеміології та мікробіології ім. Пастера, Санкт-Петербург, Російська Федерація) (36,2 %), жовткового середовища (25,5 %), селективного агару Тайера-Мартіна (HiMedia Laboratories Pvt. Ltd., Мумбаї, Індія) (14,9 %) та ГНК- агару (Федеральний бюджетний заклад науки державного центру прикладної мікробіології та біотехнології м. Оболенськ, Російська Федерація) (10,6 %) відповідно.

При порівняльному дослідженні двох способів посіву уrogenітального

матеріалу, доведено, що частота виділення *N. gonorrhoeae* із застосуванням непоживного транспортного середовища агарового гелю Amies з вугіллям (Coran Diagnostics Inc., Брешиа, Італія) була вищою, ніж прямого способу посіву: 82,6 % проти 47,8 % ( $p < 0,0005$ ).

Оптимальні показники життєздатності гонококів за зберігання у непоживному транспортному середовищі агарового гелю Amies з вугіллям були отримані за температури 2–8 °С та максимальній тривалості зберігання 24 год (93,5 %) та 48 год (73,9 %). За кімнатної температури (18–25 °С), прийнятна тривалість зберігання ізолятів *N. gonorrhoeae* була до 24 год (87 %).

За результатами валідаційного дослідження оптимізованої операційної процедури виділення *N. gonorrhoeae* культуральним методом із використанням непоживного транспортного середовища агарового гелю Amies з вугіллям і селективного шоколадного агару було з'ясовано, що частка життєздатних ізолятів та підтверджених ізолятів *N. gonorrhoeae* була високою та становила 97,2 % (137/141) і 99,3 % (136/137) відповідно. Частка виділених ізолятів *N. gonorrhoeae* від усіх офіційно зареєстрованих випадків ГІ у Тернопільській області за період 2013–2018 рр. була достатньою (19,4 %, 136/700) та вищою, ніж рекомендований ВООЗ обсяг виділення (10 %).

Дослідження аналітичних характеристик СМД порівняно із тестами Artima встановило високу специфічність культурального (100 %) та мікроскопічного методів (99,8 %) (табл. 2).

Таблиця 2

Аналітичні характеристики СМД гонококової інфекції порівняно із референтними тестами Artima у Тернопільській області

СМД	Стать	Чутливість, % [95 % ДІ]	Специфічність, % [95 % ДІ]	ППЗ, % [95 % ДІ]	ПНЗ, % [95 % ДІ]
Культуральний	жінки (N =27)	50,0 [30,3–69,7]	100 [87,2–100]	100 [87,2–100]	96,2 [80,9–99,9]
	чоловіки (N =16)	60,0 [33,2–83,0]	100 [79,4–100]	100 [79,4–100]	84,6 [58,2–97,4]
	разом (N =43)	57,1 [41,1–72,1]	100 [91,8–100]	100 [91,8–100]	92,3 [80,0–98,2]
Мікроскопічний	жінки (N =296)	50,0 [44,2–55,8]	100 [98,8–100]	100 [98,8–100]	99,7 [98,2–100]
	чоловіки (n=159)	80,0* [73,0–85,9]	99,4 [96,6–100]	80,0 [73,0–85,9]	99,4 [96,6–100]
	разом (N =455)	71,4 [67,0–75,5]	99,8 [98,8–100]	83,3 [80,0–86,6]	99,6 [98,5–100]

Примітка. Тести Artima – референтні молекулярні тести Artima Combo 2; СМД – стандартні методи діагностики; ППЗ – прогнозоване позитивне значення; ПНЗ – прогнозоване негативне значення; 95 % ДІ – межі довірчого інтервалу 95 %; N – абсолютні значення досліджуваної вибірки; \* – вірогідність відмінностей між чутливістю мікроскопічного методу у чоловіків та жінок,  $p < 0,0001$ .

Проте, чутливість обох стандартних методів діагностики ГІ була субоптимальною та становила 71,4 % у випадку застосування мікроскопічного та 57,1 % – культурального методів. Діагностична чутливість мікроскопічного методу була вищою при дослідженні уретральних виділень у чоловіків (80 %,  $p < 0,0001$ ) порівняно із цервікальними зразками у жінок (50 %).

У дослідженні доведено, що 50 % та 20 % випадків ГІ у жінок та чоловіків відповідно можуть залишатися невиявленими при застосуванні лише одного методу мікроскопії у програмах скринінгу та / або діагностики.

За допомогою тестів Artima у роботі було встановлено епідеміологічно значущий рівень поширення ГІ (1,5 %, [95 % ДІ: 0,60– 3,09]) серед дорослих осіб із симптомами уrogenітальних інфекцій у Тернопільській області, при цьому поширеність ГІ була вищою серед чоловіків (3,8 %,  $p = 0,004$ ), ніж серед жінок (0,3 %).

У роботі охарактеризовано клініко-епідеміологічні дані пацієнтів з діагностованою ГІ у Тернопільській області за період 2013–2018 рр. Зокрема, інфікування пацієнтів відбувалося переважно в межах України (93,4 %, 127/136) та регіону їх проживання (86,8 %, 118/136), за межами України були інфіковані 1,5 % (2/136) пацієнтів. Частка чоловіків, які мають статеві стосунки з чоловіками, становила 3,7 % (5/136), тоді як екстрагенітальні зразки були досліджені у 0,7 % (1/136) пацієнтів. Безсимптомні випадки ГІ в загальному становили 10,3 % (14/136) та частіше реєстрували у жінок (38,9 %, 7/18,  $p < 0,0001$ ), ніж у чоловіків (5,9 %, 7/118). Охоплення обстеженням статевих партнерів було низьким (11 %, 29/264). Візит контролю виліковності проходили 58,1 % (79/136) пацієнтів. Значною частиною пацієнтів (41,9 %, 57/136) було проігноровано візит контролю виліковності, що є підґрунтям для збереження прихованого резервуару та подальшого передавання *N. gonorrhoeae* у популяції.

У дослідженні з'ясовано застосовані схеми емпіричної антибактеріальної терапії ГІ у Тернопільській області за період 2013–2018 рр. Монотерапію цефтріаксоном (1 г внутрішньом'язово) отримували 16,79 % (22/131) пацієнтів; комбіновану терапію цефтріаксоном, у поєднанні з іншим антибіотиком (доксидикліном, кларитроміцином, азитроміцином, офлоксацином) – 67,18 % (88/131) пацієнтів. Проте, частина пацієнтів (16,03 %, 21/131) отримувала лікування сумнівної ефективності із застосуванням монотерапії кларитроміцином, доксицикліном, бензилпеніциліном, азитроміцином або офлоксацином.

За допомогою культурального методу було одержано 150 ізолятів *N. gonorrhoeae*, виділених у 130 (86,7 %) чоловіків та 20 (13,3 %) жінок. Зокрема, в Тернопільській області було зібрано 136 (90,7 %) ізолятів гонококів у 2013 – 2018 роках, у Дніпропетровській області – 14 (9,3 %) ізолятів у 2013–2014 роках.

При визначенні чутливості 150 ізолятів *N. gonorrhoeae* до восьми антибіотиків встановлено, що 11,3 % (17/150) ізолятів були резистентні до ципрофлоксацину, 6 % (9/150) – до тетрацикліну та 0,7 % (1/150) – до бензилпеніциліну. Жоден ізолят не був фенотипово резистентним до цефтріаксону, цефіксиму, азитроміцину, спектиноміцину та гентаміцину (рис. 1). Однак один ізолят мав межовий рівень резистентності до обох ЦШСД (цефтріаксону та цефіксиму) (МІК=0,125 мг/л).  $\beta$ - лактамазо-продукуючі ізоляти гонококів реєстрували у 0,7 % (1/150) ізолятів.

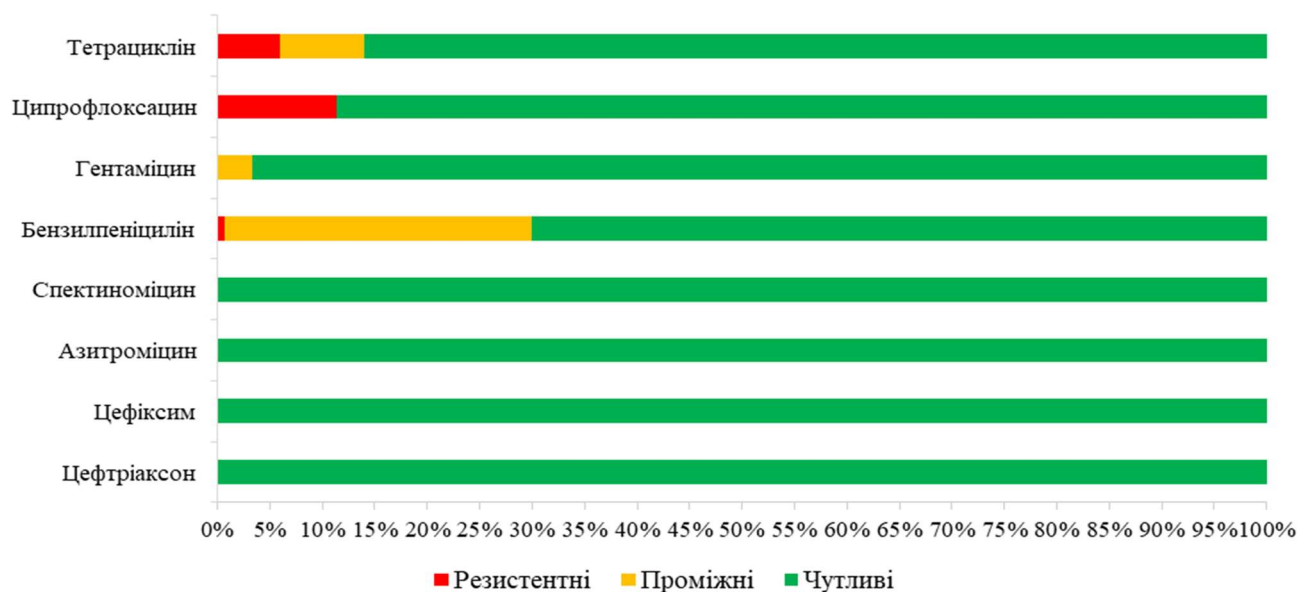


Рис. 1. Загальна фенотипова характеристика ізолятів *N. gonorrhoeae* у Тернопільській та Дніпропетровській областях за період 2013–2018 років.

Повне секвенування геному 150 ізолятів *N. gonorrhoeae* встановило генетичну гетерогенність ізолятів гонококів, які циркулювали в Україні у період 2013–2018 рр. Було визначено 25 різних MLST ST, 50 NG-MAST ST та 34 NG-STAR ST (рис. 2).

Завдяки філогеномному аналізу визначено шість основних кластерів (С1 – С6) української популяції гонококів, які було порівняно із міжнародною популяцією гонококів, виділених у країнах Європейського союзу та Європейської економічної зони (рис.2). До кластерів С2, С3, С4 та С6 відносилися більшість ізолятів (83,3 %), вони були геномно споріднені з міжнародно описаним мультичутливим до антибактеріальних препаратів родоводом гонококів. Кластери С1 та С5 включали 16,7 % ізолятів та асоціювалися з резистентністю до ципрофлоксацину, тетрацикліну, бензилпеніциліну, а також з межевою за МІК чутливістю до ЦШСД та були геномно споріднені з міжнародно поширеним мультирезистентним родоводом гонококів.

Резистентність до ципрофлоксацину була зумовлена мутаціями *gyrA* гену (11,3 %) із наступними амінокислотними замінами GyrA у позиціях S91 та D95 (S91F+D95A (1,3 %) або S91F+D95G (10 %)) та мутаціями *parC* гену (8,7 %), спричиняючи амінокислотні заміни ParC S87R (6 %), E91G (1,3 %), D86N (0,7 %), або S87N (0,7 %). Резистентність до тетрацикліну була закріплена мутацією гену *rpsJ* з амінокислотним заміщенням V57M у білку S10 (16,7 %) і/або набуттям кон'югованих плазмід-носіїв гену *tetM* (4,7 %). Резистентність та знижена чутливість до пеніцилінів була пов'язана із мозаїчною *penA*- 34,001 алеллю (2,7 %); продукцією β- лактамази (0,7 %); мутаціями в ділянці промотора та / або послідовності кодування *mtrR* гена (11,3 %); несинонімічними замінами амінокислот G101 та A102 у білку порині зовнішньої мембрани клітинної стінки PorB1b (12,7 %) та мутацією *ponA1*, що викликає амінокислотну зміну L421P у пеніцилін-зв'язувальному білку першого типу PBP1 (16,7 %). Виявлено один (0,7 %) ізолят міжнародно поширеного мультирезистентного NG-MAST ST1407, MLST ST1901 клону із фенотиповими ознаками межевої резистентності до цефтріаксону й цефіксиму (рис. 3).

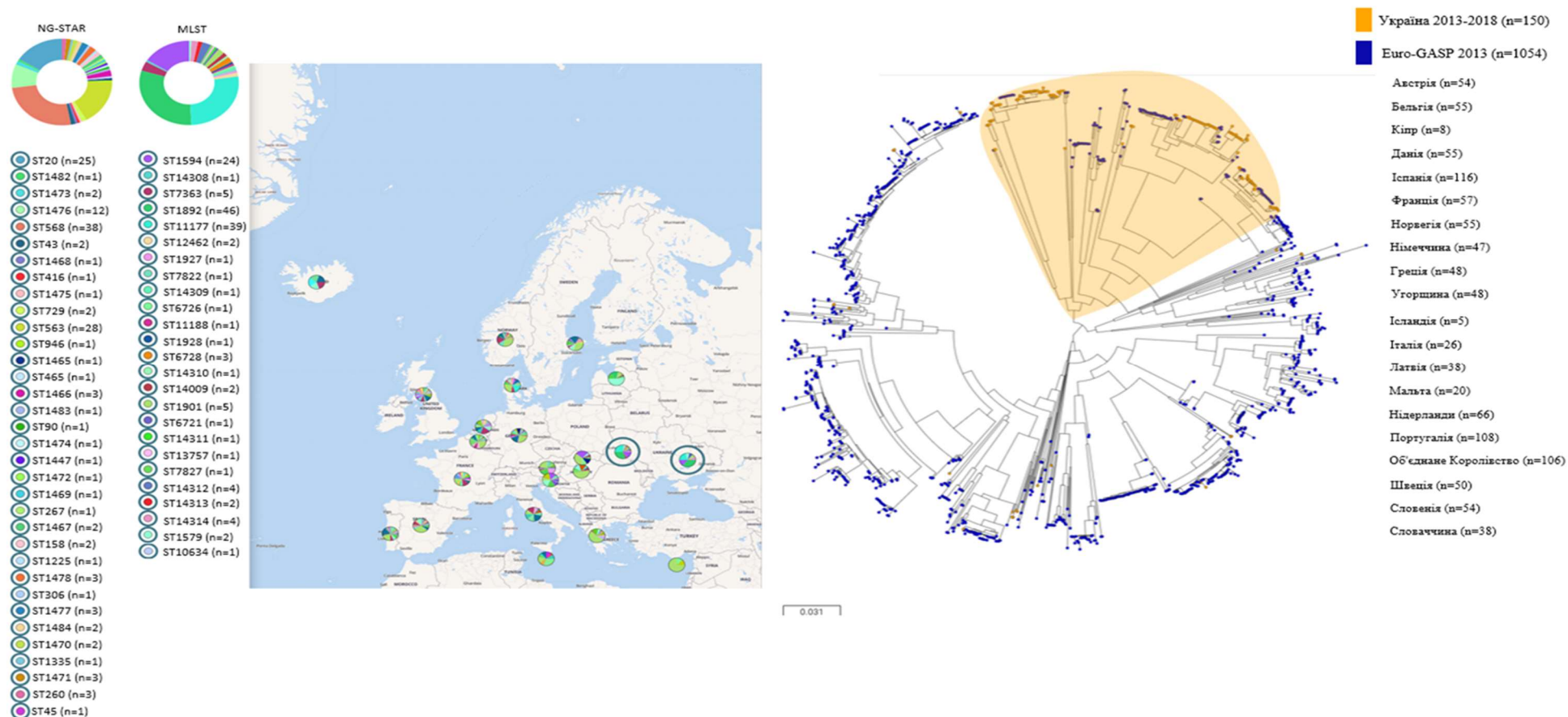


Рис. 2. Геномна епідеміологія і філогеографія з демонстрацією спорідненості ізолятів *N. gonorrhoeae*, виділених в Україні впродовж 2013–2018 рр., (n=150) порівняно з геномами ізолятів, зібраних у 20 країнах Європейського Союзу та Європейської економічної зони у 2013 р. (n=1054) (на радіальній дендрогамі ізоляти з України позначені помаранчевим кольором; ізоляти з країн Європейського союзу та Європейської економічної зони – синім кольором; міжнародно описаний мультичутливий до антибактеріальних препаратів родівід гонококів позначений сектором помаранчевого кольору; поза сектором знаходяться ізоляти, споріднені із міжнародно поширеним мультирезистентним родоводом; NG- STAR – типування послідовностей *Neisseria gonorrhoeae* щодо резистентності до антибіотиків (n=34 секвенс-типів); MLST – мультилокусне типування послідовностей (n=25 секвенс-типів); відображено за допомогою платформи Microreact).

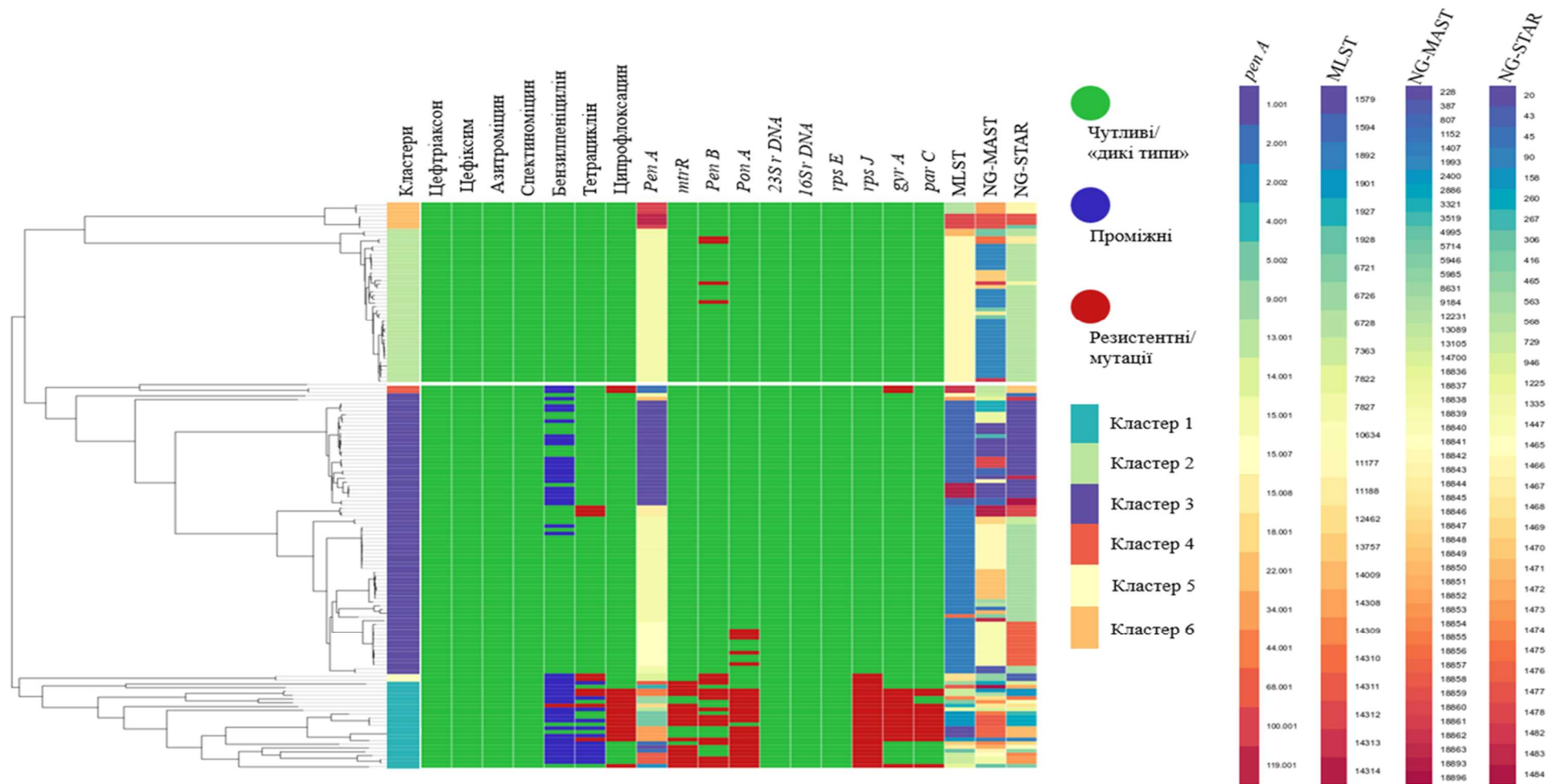


Рис. 3. Горизонтальна дендрограма результатів повного секвенування геному ізолятів *N. gonorrhoeae*, виділених в Україні у 2013–2018 рр., та їх кластерного генетичного групування порівняно з даними фенотипу, антигенними детермінантами антибіотикорезистентності (*penA*, *mtrR*, *penB*, *ponA*, *23S rRNA*, *16S rRNA*, *rpsE*, *rpsJ*, *gyrA*, *parC*), типами *penA* алелей (n = 18, в тому числі 4 мозаїчні алелі) та молекулярним типуванням гонококів (MLST – мультилокусне типування послідовностей (n=25 секвенс-типів); NG-MAST – мультиантигенне типування послідовностей *Neisseria gonorrhoeae* (n=50 секвенс-типів); NG-STAR – типування послідовностей *Neisseria gonorrhoeae* щодо резистентності до антибіотиків (n=34 секвенс-типів)).

## ВИСНОВКИ

У дисертаційній роботі наведено теоретичне узагальнення та вирішення актуального завдання сучасної мікробіології щодо детального оцінювання та оптимізації мікробіологічної діагностики гонококової інфекції на базі обласних шкірно-венерологічних диспансерів в Україні, дослідженню епідеміологічних особливостей гонококової інфекції, антибіотикорезистентності та геномної епідеміології ізолятів *N. gonorrhoeae*, які циркулювали в Україні у період 2013 – 2018 рр.

1. Стан мікробіологічної діагностики гонококової інфекції в обласних шкірно-венерологічних диспансерах в Україні не відповідає рекомендаціям ВООЗ стосовно пріоритетного використання молекулярного аналізу нуклеїнових кислот, визначення антибіотикорезистентності *N. gonorrhoeae* та застосування системи зовнішнього контролю якості. Лабораторії обласних шкірно-венерологічних диспансерів не проводять метод ампліфікації нуклеїнових кислот (0 % [95 % ДІ: 0,0–23,2]). Зовнішній контроль якості мікробіологічних досліджень із виділення *N. gonorrhoeae* здійснюють 50 % [95 % ДІ: 21,1–78,9] диспансерів. Більшість (85,7 % [95 % ДІ: 57,2–98,2]) диспансерів не визначають антибіотикорезистентності *N. gonorrhoeae*.

2. При аналітичному вивченні характеристик стандартних методів діагностики гонококової інфекції встановлено високу специфічність культурального (100 %) та мікроскопічного (99,8 %) методів дослідження уrogenітальних виділень. Чутливість мікроскопічного методу із забарвленням уrogenітального матеріалу метиленовим синім і за Грамом (71,4 %) вірогідно вища відносно культурального методу (57,1 %). Чутливість мікроскопічного методу є вірогідно вищою при дослідженні уретральних виділень у чоловіків (80 %) порівняно із цервікальними зразками у жінок (50 %).

3. При вивченні ростових властивостей поживних середовищ встановлено, що селективний шоколадний агар забезпечує вірогідно вищу частоту виділення (91,5 %) клінічних ізолятів *N. gonorrhoeae*. Частота виділення *N. gonorrhoeae* за допомогою посіву уrogenітального матеріалу із застосуванням непоживного транспортного середовища агарового гелю Amies з вугіллям є вірогідно вищою (82,6 %) в порівнянні з прямим способом посіву (47,8 %). Показники життєздатності гонококів за зберігання у непоживному транспортному середовищі агарового гелю Amies з вугіллям є оптимальними за температури 2–8 °С та тривалості зберігання 24 год (93,5 %) і 48 год (73,9 %). За кімнатної температури (18–25 °С), прийнятна тривалість зберігання ізолятів *N. gonorrhoeae* становить до 24 год (87 %).

4. Епідеміологічними особливостями гонококової інфекції у Тернопільській області є поширеність 1,5 % серед пацієнтів із симптомами уrogenітальних інфекцій та локальний характер – інфікування більшості пацієнтів відбувається в межах України (93,4 %) і регіону проживання (86,8 %). Існує ризик імпортування гонококової інфекції з інших країн (1,5 %). Безсимптомні випадки в загальному становлять 10,3 % та є вірогідно частішими серед жінок (38,9 %,  $p < 0,0001$ ), ніж серед чоловіків (5,9 %). Недостатні рівні обстеження контактних осіб (11 %) та дослідження екстрагенітальних зразків (0,7%) сприяють збереженню прихованого резервуару та подальшого передавання *N. gonorrhoeae* у популяції.



Переважаючою схемою антибактеріальної терапії гонококової інфекції є комбінована терапія цефтріаксоном, у поєднанні з іншим антибіотиком (доксидиклін, кларитроміцин, азитроміцин, офлоксацин), яку застосовують у 67,18 % пацієнтів. Показники застосування монотерапії цефтріаксоном становлять 16,79 %, а іншим антибіотиком (кларитроміцин, доксициклін, бензилпеніцилін, азитроміцин) – 16,03 %.

5. Резистентність ізолятів *N. gonorrhoeae* до ципрофлоксацину становить 11,3 %, до тетрацикліну – 6 % та до бензилпеніциліну – 0,7 %. Усі досліджені ізоляти є чутливими до цефтріаксону, цефіксиму, азитроміцину, спектиноміцину та гентаміцину. Межовий рівень резистентності ізолятів гонококів до обох цефалоспоринів широкого спектра дії становить 0,7 %.

6. Резистентність ізолятів *N. gonorrhoeae* до ципрофлоксацину зумовлена мутаціями генів *gyrA* (11,3 %) та *parC* (8,7 %); до тетрацикліну – *rpsJ V57M* мутацією (16,7 %) та набуттям кон'югованих плазмід-носіїв гену *tetM* (4,7 %); до бензилпеніциліну – мозаїчною алеллю *penA-34,001* (2,7 %), продукцією  $\beta$ -лактамази (0,7 %) та мутаціями *ponA1*, що спричиняють L421P амінокислотні заміни у пеніцилін-зв'язувальному білку першого типу PBP1 (16,7 %). Зниження чутливості до  $\beta$ -лактамних антибіотиків, макролідів та тетрациклінів зумовлене мутаціями *mtrR* (11,3 %), до  $\beta$ -лактамних антибіотиків та тетрациклінів – несинонімічними амінокислотними заміщеннями G101 та A102 у білку порині зовнішньої мембрани клітинної стінки PorB1b (12,7 %).

7. Популяція гонококів, що циркулює в Україні, характеризується генетичною гетерогенністю та представлена 25 різними MLST секвенс-типами, 50 NG-MAST секвенс-типами, 34 NG-STAR типами та 6 основними філогеномними кластерами. Встановлено, що більшість ізолятів гонококів (83,3 %) належать до кластерів C2, C3, C4 та C6, генетично споріднених із міжнародно описаним мультичутливим до антибактеріальних препаратів родоводом гонококів. Для 16,7 % ізолятів гонококів доведена належність до кластерів C1 та C5, генетично асоційованих з міжнародно описаним мультирезистентним родоводом гонококів із фенотиповими ознаками резистентності одночасно до двох чи більше антибактеріальних препаратів (бензилпеніциліну, тетрацикліну, ципрофлоксацину), а також з межевою чутливістю до цефалоспоринів широкого спектра дії. До мультирезистентного клону NG-MAST ST1407, MLST ST1901 належать 0,7 % ізолятів із фенотиповими ознаками межевої резистентності до цефалоспоринів широкого спектра дії.

## ПРАКТИЧНІ РЕКОМЕНДАЦІЇ

1. Для покращення мікробіологічної діагностики ГІ в Україні, рекомендовано запровадження національної системи зовнішнього контролю якості відповідно до міжнародних протоколів ВООЗ, в тому числі з організацією міжнародного контролю якості.

2. Для оптимізації мікробіологічної діагностики гонококової інфекції та для спостереження за антибіотикорезистентністю *N. gonorrhoeae* в Україні рекомендовано невідкладне та широке впровадження валідованих та якісно гарантованих методів ампліфікації нуклеїнових кислот у поєднанні із культуральним

методом виділення *N. gonorrhoeae*.

3. Валідована, оптимізована та якісно гарантована оптимізована операційна процедура виділення *N. gonorrhoeae* культуральним методом із використанням непоживного транспортного середовища агарового гелю Amies з вугіллям і селективного шоколадного агару може бути використана у практиці бактеріологічних лабораторій в Україні та закордоном. Перед посівом рекомендовано тимчасово зберігати біологічні зразки у непоживному транспортному середовищі агарового гелю Amies з вугіллям при температурі 2–8 °С терміном до 48 год.

4. Цефтріаксон (1 г внутрішньом'язово) у вигляді монотерапії або у поєднанні з азитроміцином (2 г перорально) може залишатися як перша лінія емпіричного лікування ГІ. За наявності супутньої уrogenітальної інфекції, викликаной *Chlamydia trachomatis*, або за неможливості виключити *C. trachomatis* за допомогою МАНК, спектиноміцин (2 г внутрішньом'язово) може бути антибіотиком другої лінії. Проте, якщо додатково діагностований гонококовий фарингіт, то спектиноміцин (2 г внутрішньом'язово) слід призначати у поєднанні з азитроміцином (2 г перорально). Ципрофлоксацин, тетрациклін та бензилпеніцилін рекомендовано виключити зі схем емпіричного лікування ГІ.

5. Для своєчасного оновлення настанов щодо лікування та забезпечення ефективного управління ГІ необхідно запровадити системний, постійний та національний нагляд за антибіотикорезистентністю *N. gonorrhoeae* в Україні у поєднанні зі збором клінічної інформації про пацієнтів, призначене лікування та випадки неефективного лікування ГІ.

### СПИСОК ОПУБЛІКОВАНИХ ПРАЦЬ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ

1. Jacobsson S., **Boiko I.**, Golparian D., Blondeel K., Kiarie J., Toskin I., Peeling R. W., Unemo M. WHO laboratory validation of Xpert®CT/NG and Xpert®TV on the GeneXpert system verifies high performances. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*. 2018. № 126 (12). С. 907 – 912. (Особистий внесок – брала участь в аналізі літератури, узагальненні результатів проведених досліджень та підготовці статті).

2. **Boiko I.**, Golparian D., Krynytska I., Bezkorovaina H., Frankenberg A., Onuchyna M., Jacobsson S., Unemo M. Antimicrobial susceptibility of *Neisseria gonorrhoeae* isolates and treatment of gonorrhoea patients in Ternopil and Dnipropetrovsk regions of Ukraine, 2013 – 2018. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*. 2019. № 127 (7). С. 503 – 509. (Особистий внесок – брала участь в плануванні експерименту, аналізі літератури, проведенні експериментальних досліджень та їх статистичної обробки, підготовці статті до друку).

3. **Boiko I.**, Golparian D., Krynytska I., Unemo M. High prevalence of *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae* and particularly *Trichomonas vaginalis* diagnosed using US FDA-approved Aptima Combo 2 molecular tests and evaluation of conventional routine diagnostic tests in Ternopil, Ukraine. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*. 2019. № 127 (9). С. 627 – 634. (Особистий внесок – брала участь в плануванні експерименту, аналізі літератури,

проведенні експериментальних досліджень та їх статистичної обробки, підготовці статті).

4. Unemo M., Clarke E., **Boiko I.**, Patel C., Patel R. Adherence to the 2012 European gonorrhoea guideline in the WHO European Region according to the 2018–19 International Union against Sexually Transmitted Infections European Collaborative Clinical Group gonorrhoea survey. *International Journal of STD & AIDS*. 2020. № 31 (1). С. 69 – 76. (Особистий внесок – брала участь в аналізі літератури, статистичній обробці результатів експериментальних досліджень, підготовці статті).

5. **Boiko I.**, Golparian D., Jacobsson S., Krynytska I., Frankenberg A., Shevchenko T., Unemo M. Genomic epidemiology and antimicrobial resistance determinants of *Neisseria gonorrhoeae* isolates from Ukraine, 2013 – 2018. *Acta Pathologica, Microbiologica, et Immunologica Scandinavica*. 2020. № 128 (7). С. 465 – 475. (Особистий внесок – брала участь в плануванні експерименту, аналізі літератури, проведенні експериментальних досліджень та їх статистичної обробки, підготовці статті).

6. **Бойко І. Б.**, Криницька І. Я., Когут І. Й. Діагностика гонореї в Україні відповідно до рекомендацій ВООЗ. *Український журнал дерматології, венерології, косметології*. 2020. № 1 (76). С. 7 – 14. (Особистий внесок – брала участь в плануванні експерименту, аналізі літератури, проведенні експериментальних досліджень та їх статистичної обробки, підготовці статті).

7. **Boiko I.**, Golparian D., Krynytska I., Bezkorovaina H., Frankenberg A., Onuchyna M., Jacobsson S., Unemo M. High antimicrobial susceptibility in *Neisseria gonorrhoeae* isolates in Ternopil and Dnipropetrovsk regions of Ukraine during 2013 – 2017. *International Union against Sexually Transmitted Infections (IUSTI) World + European Congress 2018: Abstract materials, 27 – 30 June 2018. Dublin, Ireland, 2018.* – Electronic Poster and oral presentation. URL: <https://www.morressier.com/article/01--high-antimicrobial-susceptibility-neisseria-gonorrhoeae-isolates-ternopil-dnipropetrovsk-regions-ukraine-during-20132017/5af060631dd164001d5ef28b> (дата звернення: 08.02.2021). (Особистий внесок – автором розроблено план експерименту, виконано аналіз літератури, експериментальні дослідження та їх статистичну обробку, підготовлено, поданого до друку тези, представлено доповідь, одержано відзнаку за найкращу презентацію конгресу).

8. **Boiko I.**, Golparian D., Krynytska I., Unemo M. P – 18. Genomic epidemiology and antimicrobial resistance of *Neisseria gonorrhoeae* isolates: first data from Ukraine, 2013 – 2018. *33d IUSTI-Europe Congress on Sexually Transmitted Infections: Abstract materials, 5 – 7 September 2019. Tallinn, Estonia, 2019.* С. 91. (Особистий внесок – брала участь в плануванні експерименту, аналізі літератури, проведенні експериментальних досліджень та їх статистичної обробки, підготовці та проведенні презентації).

9. **Бойко І.**, Безкоровайна Г. Практика виділення чистих культур *Neisseria gonorrhoeae* у Тернопільській області з метою вивчення антибіотикорезистентності. *Дерматологія та венерологія*. 2015. № 3 (69). С. 96. (Особистий внесок – автором виконано планування експерименту, аналіз

літератури, проведено експеримент, їх статистичний аналіз, підготовці тез до публікації).

10. **Бойко І. Б.**, Безкоровайна Г. О. Поліпшення якості мікробіологічної діагностики гонококової інфекції з метою систематичного моніторингу антибіотикорезистентності. *Український журнал дерматології, венерології, косметології*. 2016. № 4 (63). С. 124 – 125. (Особистий внесок – брала участь в аналізі літератури, проведенні експериментальних досліджень та їх статистичної обробки, підготовці тез до публікації).

11. **Бойко І. Б.** Локальний моніторинг антибіотикорезистентності *Neisseria gonorrhoeae* у Тернопільській області. *Журнал дерматовенерології та косметології імені М. О. Горсуєва*. 2017. № 1 (37). С. 70 – 71.

### АНОТАЦІЯ

**Бойко І.Б.** Мікробіологічна діагностика гонококової інфекції, антибіотикорезистентність та геномна епідеміологія *Neisseria gonorrhoeae* в Україні. – На правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 03.00.07 – мікробіологія. – Вінницький національний медичний університет імені М.І. Пирогова МОЗ України, Вінниця, 2021.

Дисертаційна робота присвячена оцінюванню та оптимізації мікробіологічної діагностики гонококової інфекції, дослідженню антибіотикорезистентності та геномної епідеміології ізолятів *N. gonorrhoeae* в Україні у період 2013– 2018 рр.

Усього 11,3 % ізолятів *N. gonorrhoeae* були резистентні до ципрофлоксацину, 6 % – до тетрацикліну та 0,7 % – до бензилпеніциліну. Один ізолят належав до міжнародно поширеного мультирезистентного NG- MAST ST1407, MLST ST1901 клону.

Резистентність до ципрофлоксацину була зумовлена мутаціями генів *gyrA* (11,3 %) та *parC* (8,7 %); до тетрацикліну – *rpsJ* V57M (16,7 %) і / або *tetM* (4,7 %); до пеніцилінів – мозаїчною *penA*- 34,001 алеллю (2,7 %), продукцією β- лактамази (0,7 %); *mtrR* (11,3 %); мутаціями у білку PorB1b (12,7 %) та гені *ponA1* (16,7 %).

**Ключові слова:** *Neisseria gonorrhoeae*, гонококова інфекція, антибіотикорезистентність, повне секвенування геному, мікробіологічна діагностика, епідеміологія.

### АННОТАЦИЯ

**Бойко І.Б.** Микробиологическая диагностика гонококковой инфекции, антибиотикорезистентность и геномная эпидемиология *Neisseria gonorrhoeae* в Украине. – На правах рукописи.

Диссертация на соискание ученой степени кандидата медицинских наук по специальности 03.00.07 – микробиология. – Винницкий национальный медицинский университет имени Н. И. Пирогова МЗ Украины, Винница, 2021.

Диссертация посвящена анализу и оптимизации микробиологической диагностики гонококковой инфекции, исследованию антибиотикорезистентности и геномной эпидемиологии изолятов *N. gonorrhoeae* в Украине за период

2013 – 2018 гг.

Всего 11,3 % изолятов *N. gonorrhoeae* были резистентны к ципрофлоксацину, 6 % – к тетрациклину и 0,7 % – к бензилпеницилину. Один (0,7 %) изолят имел характеристики международно распространенного мультирезистентного NG-MAST ST1407, MLST ST1901 клона.

Резистентность к ципрофлоксацину была вызвана мутациями генов *gyrA* (11,3 %) и *parC* (8,7 %); к тетрациклину – *rpsJ* V57M (16,7 %) и / или *tetM* (4,7 %); к пенициллинам – мозаичной *penA*- 34,001 аллелью (2,7 %), продукцией β- лактамазы (0,7 %); *mtrR* (11,3 %); мутациями в белке PorB1b (12,7 %) и гене *ponA1* (16,7 %).

**Ключевые слова:** *Neisseria gonorrhoeae*, гонококковая инфекция, антибиотикорезистентность, полное секвенирование генома, микробиологическая диагностика, эпидемиология.

## SUMMARY

**Boiko I. B. Microbiological diagnosis of gonococcal infection, antimicrobial resistance and genomic epidemiology of *Neisseria gonorrhoeae* in Ukraine. – Manuscript.**

Dissertation for the scientific degree of the candidate of medical sciences in specialty 03.00.07 «Microbiology». (22 Healthcare). – National Pirogov Memorial Medical University, Vinnytsya, Ministry of Public Health of Ukraine, Vinnytsya, 2021.

The dissertation is devoted to the evaluation and optimization of microbiologic diagnosis of gonococcal infection in Regional Dermato-Venereological Dispensaries in Ukraine, examination of the epidemiological features of gonococcal infection, antimicrobial resistance, and genomic epidemiology of *N. gonorrhoeae* isolates that circulated in Ukraine in 2013–2018.

The microbiologic diagnosis of gonococcal infection did not comply with WHO recommendations. The laboratories of the dispensaries did not use diagnostic nucleic acid amplification tests (NAATs) in the period 2013–2014, and only 50.0 % of respondents had access to NAATs in 2018. External quality laboratory control to identify *N. gonorrhoeae* was carried out by 50.0 % of respondents. Most (85.7 %) of the respondents did not determine the antimicrobial resistance of *N. gonorrhoeae* isolates.

Selective chocolate agar demonstrated superior growth characteristics for gonococci isolation (91.5 %,  $p < 0.0001$ ). The isolation rate of *N. gonorrhoeae* using non-nutritive transporting medium Amies with charcoal was higher than the bedside method: 82.6 % versus 47.8 %,  $p < 0.0005$ .

Optimal viability of gonococci was obtained at a temperature of 2–8 °C and a storage time of a maximum of 24 hours (93.5 %) followed by 48 hours (73.9 %). At room temperature (18–25 °C), acceptable storage time of *N. gonorrhoeae* isolates was up to 24 hours (87.0 %).

Sensitivity of culture (71.4 %) and microscopy of urogenital specimens (57.1 %) was established compared to the international Aptima Combo 2 (Hologic Inc., San Diego, USA) reference NAAT.

The prevalence of gonococcal infection, determined by Aptima Combo 2 NAAT, among adult patients with symptoms of urogenital infections in Ternopil region ( $n=455$ ) was 1.5 % and was higher among men (3.8 %,  $p=0.004$ ) than among women (0.3 %).

The epidemiological features of gonococcal infection in Ternopil region were: patients were mainly infected within Ukraine (93.4 %) and in their area of residence (86.8 %), some patients (1,5 %) were infected abroad. The proportion of men who had sex with men was 3.7 %; extra-genital samples were examined in 0.7 % of patients; asymptomatic gonococcal infections were recorded more often in women (38.9 %,  $p < 0.0001$ ) than in men (5.9 %); low rate of sexual partners examined (11.0 %); and 58.1 % of patients underwent a test of cure.

Ceftriaxone monotherapy (1 g intramuscularly) was received by 16.79 % of patients; monotherapy with another antibiotic (clarithromycin, doxycycline, benzylpenicillin, azithromycin) - by 16.03 % of patients; therapy with ceftriaxone in combination with another antibiotic (doxycycline, clarithromycin, azithromycin, ofloxacin) - by 67.18 % of patients.

Determination of the antimicrobial susceptibility of 150 *N. gonorrhoeae* isolates to eight antibiotics showed that 11.3 % isolates were resistant to ciprofloxacin, 6.0 % to tetracycline and 0.7 % to benzylpenicillin. None of the isolates was phenotypically resistant to ceftriaxone, cefixime, azithromycin, spectinomycin, or gentamicin.

Whole genome sequencing of 150 *N. gonorrhoeae* isolates established the heterogeneity of gonococcus isolates. Six main clusters (C1–C6) of the gonococcal population were identified. Clusters C2, C3, C4 and C6 were genomically associated with the internationally described multidrug-susceptible gonococcal lineage and contained the majority of isolates (83.3 %). Clusters C1 and C5 included 16.7 % of isolates and were associated with resistance to ciprofloxacin, tetracycline, benzylpenicillin, as well as with borderline resistance to extended-spectrum cephalosporins and azithromycin.

Resistance to ciprofloxacin was due to *gyrA* gene mutations (11.3 % of all isolates) and *parC* gene mutations (8.7 %). Tetracycline resistance was caused by the *rpsJ* V57M mutation (16.7 %) and / or presence of *tetM* (4.7 %). Resistance and decreased susceptibility to penicillins was associated with the mosaic *penA*-34.001 allele (2.7 %),  $\beta$ -lactamase production (0.7 %), *mtrR* (11.3 %), non-synonymous substitutions of amino acids G101 and A102 in PorB1b (12.7 %) and the *ponA1* mutation. One (0.7 %) isolate of the internationally spreading multidrug-resistant NG-MAST ST1407, MLST ST1901 clone, with borderline resistance to ceftriaxone and cefixime, was detected.

**Key words:** *Neisseria gonorrhoeae*, gonococcal infection, antimicrobial resistance, whole genome sequencing, microbiologic diagnosis, epidemiology.

## ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ, СКОРОЧЕНЬ І ТЕРМІНІВ

<b>АБР</b>	– антибіотикорезистентність
<b>ВООЗ</b>	– Всесвітня організація охорони здоров'я
<b>ГІ</b>	– гонококова інфекція
<b>ДІ</b>	– довірчий інтервал
<b>ІПСШ</b>	– інфекції, які передаються статевим шляхом
<b>МАНК</b>	– метод ампліфікації нуклеїнових кислот
<b>МІК</b>	– мінімальна інгібувальна концентрація
<b>НПК</b>	– науково-практична конференція
<b>ОШВД</b>	– обласні шкірно-венерологічних диспансери
<b>ПСГ</b>	– повне секвенування геному
<b>СМД</b>	– стандартні методи діагностики
<b>ТОКШВД</b>	– Комунальна установа Тернопільської обласної ради «Тернопільський обласний клінічний шкірно-венерологічний диспансер»
<b>ЦШСД</b>	– цефалоспорини широкого спектра дії
<b>тест(и) Aptima</b>	– референтні молекулярні тести Aptima Combo 2 (Hologic Inc., Сан Дієго, Каліфорнія, США)
<b>MALDI-TOF MS</b>	– час-пролітний мас-спектрометричний аналіз за типом матрикс-асоційованої спектрометрії часу прольоту десорбованих лазером іонізованих мас
<b>MLST</b>	– мультилокусне типування послідовностей, multi-locus sequence typing
<b>NG-MAST</b>	– мультиантигенне типування послідовностей <i>N. gonorrhoeae</i> ; <i>N. gonorrhoeae</i> multi-antigen sequence typing
<b>NG-STAR</b>	– типування послідовностей <i>N. gonorrhoeae</i> щодо резистентності до антибіотиків; <i>N. gonorrhoeae</i> sequence typing for antimicrobial resistance
<b>р</b>	– критерій достовірності відмінностей
<b>ST</b>	– секвенс-тип(и)

---

Підписано до друку 11.02.2021 р. Замовл. № 098.  
Формат 60x90 1/16 ум. друк. арк. 0,8 друк офсетний.  
Наклад 100 примірників.

---

Вінниця. Друкарня ВНМУ імені М.І. Пирогова, вул. Пирогова, 56.

