

И.А. ЭЙДЕЛЬШТЕЙН¹, к.б.н., М.В. ЭЙДЕЛЬШТЕЙН¹, к.б.н., Е.В. ШИПИЦЫНА², д.б.н., Т.А. ХУСНУТДИНОВА², М.И. ОТВАГИНА¹, А.М. САВИЧЕВА², д.м.н., профессор, Р.С. КОЗЛОВ¹, д.м.н., профессор, Ю.В. ВИННИКОВА³, О.Ю. КУЦЕВАЛОВА⁴, к.б.н., И.В. БОРИСОВ⁵, к.б.н.

¹ Смоленский государственный медицинский университет Минздрава России

² «НИИ акушерства и гинекологии им. Д.О. Отта» СЗО РАМН, Санкт-Петербург

³ ООО «Клинико-диагностическая лаборатория «Здоровье», Барнаул

⁴ Ростовский научно-исследовательский онкологический институт Минздрава России

⁵ Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов РАН, Саратов

СУЩЕСТВУЕТ ЛИ ПРОБЛЕМА МУТАЦИОННОЙ УСТОЙЧИВОСТИ К ФТОРХИНОЛОНАМ У *CHLAMYDIA TRACHOMATIS*

РОССИЙСКИЕ ДАННЫЕ

До настоящего времени мутационная устойчивость *C. trachomatis* к фторхинолонам (ФХ), которые используются, наряду с макролидами и тетрациклинами, для лечения хламидийных инфекций, не была описана в клинической практике. Возможность селекции мутаций резистентности к ФХ (преимущественно в участке QRDR *gyrA*) была продемонстрирована исключительно в экспериментах *in vitro*. В статье описан впервые выявленный клинический случай наличия типичной мутации устойчивости к ФХ в QRDR *gyrA* *C. trachomatis*. Проведенное исследование тем не менее показывает, что классические механизмы резистентности к ФХ встречаются крайне редко в популяции клинических штаммов *C. trachomatis*.

Ключевые слова:

Chlamydia trachomatis

фторхинолоны

топоизомеразы

QRDR, *GyrA*, мутации

ВВЕДЕНИЕ

Облигатный внутриклеточный микроорганизм *Chlamydia trachomatis* в настоящее время рассматривается как самый распространенный бактериальный возбудитель заболеваний, передающихся половым путем.

Внутриклеточный цикл развития хламидий предполагает использование для терапии антибиотиков, способных накапливаться в клетках и препятствовать размножению возбудителя. Данными свойствами обладают тетрациклины, макролиды, азалиды и фторхинолоны (ФХ).

Макролиды (азитромицин) и тетрациклины (доксикалин) являются антибиотиками выбора при лечении заболеваний, вызванных *C. trachomatis*. Известно, что фторхинолоны также демонстрируют высокую антихламидийную активность *in vitro* и рассматриваются как альтернативные препараты для терапии хламидийной инфекции преимущественно в сочетании с гонококковой. ФХ являются одними из наиболее широко используемых в России антимикробных препаратов (40% от общего количества

антимикробных препаратов), особенно в урологической практике. Таким образом, широкое применение ФХ создает условия селективного давления на патогенные микроорганизмы и может способствовать отбору штаммов с приобретенной устойчивостью.

До настоящего времени проблема развития антибиотикорезистентности у хламидий изучена недостаточно хорошо, исключая случаи описательного характера и публикации, указывающие на возможное отсутствие эффекта терапии у пациентов с хламидийной инфекцией [1]. В отдельных работах эффект множественной резистентности выделенных штаммов связывают с фенотипической (гетеротипической) резистентностью, но не с генетической (мутационной) устойчивостью, поскольку молекулярные мишени для разных групп антимикробных препаратов различны. До настоящего времени, однако, случаи выделения клинических изолятов *C. trachomatis*, проявляющих стабильный фенотип резистентности вследствие наличия известных генетических механизмов, не были описаны.

Вместе с тем была продемонстрирована возможность *in vitro* селекции мутаций устойчивости к моксифлоксацину и ципрофлоксацину у штаммов *C. trachomatis* LGV2 при их последовательном культивировании на среде с возрастающей концентрацией антибиотика [2].

В России изучению проблемы антибиотикорезистентности *C. trachomatis* посвящен ряд работ, включая исследование *in vitro* чувствительности к ФХ клинических изо-

лятов, выделенных у пациентов с предполагаемой неэффективностью антибактериальной терапии, с использованием культурального метода [3–6]. В этих работах также предпринята попытка анализа молекулярно-генетических механизмов устойчивости изолятов со сниженной чувствительностью к ФХ путем прямого секвенирования генов-мишеней ФХ (*gyrA* и *parC*). Однако в ходе данного анализа были выявлены лишь мутации, приводящие к аминокислотным заменам вне участков связывания ФХ (quinolone resistance determining regions, QRDRs), что позволяет сделать вывод о возможном наличии у хламидий альтернативных механизмов устойчивости к данным антибиотикам [3,4,7].

До настоящего времени проблема развития антибиотикорезистентности у хламидий изучена недостаточно хорошо, исключая случаи описательного характера и публикации, указывающие на возможное отсутствие эффекта терапии у пациентов с хламидийной инфекцией

Выделение *C. trachomatis* в культуре клеток является трудоемким и длительным процессом, а изучение антибиотикочувствительности осложняется отсутствием стандартизированной методики и критериев интерпретации данных, а также понимания взаимосвязи между результатами, полученными *in vitro*, и клиническим исходом терапии [8–10]. Многочисленные исследования показывают, что данные оценки уровня устойчивости к антихламидийным препаратам, полученные при использовании различных вариантов методов культивирования, могут существенно отличаться [11].

В последние годы интенсивно разрабатываются молекулярные методы для выявления генетических детерминант резистентности у микроорганизмов. Мутации в генах, приводящие к модификации мишени связывания с антибиотиком, описаны для различных групп препаратов. Основой формирования резистентности к ФХ у грамотрицательных бактерий являются аминокислотные замены в QRDR участках каталитических субъединиц ДНК-гиразы (*GyrA*, участок между аминокислотными остатками 67 и 106, обычно в позициях 83 и 87) и топоизомеразы IV (*ParC*, позиции 80 и 84), приводящие к снижению их аффинности к хинолонам. Для определения мутаций устойчивости к фторхинолонам в QRDR генов-мишеней (*gyrA* и *parC*) *C. trachomatis* нами была использована методика на основе ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ), описанная ранее [17].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Клинические образцы. В исследование было включено 1 863 клинических образца (соскобы из цервикального канала женщин и уретры мужчин), полученных в 2009–2015 гг., от пациентов с инфекциями урогенитального тракта различной локализации. Материал был полу-

чен из локальных лабораторий, где осуществлялся предварительный скрининг образцов на наличие ДНК *C. trachomatis* с использованием доступных на российском рынке коммерческих тест-систем на основе технологии ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ). Выделение ДНК проводили принятыми в каждой лаборатории наборами реагентов. Очищенную ДНК хранили при -70 °C до момента анализа.

ПЦР в режиме реального времени для анализа мутаций в QRDR *gyrA* и *parC*. Наличие мутаций в QRDR генов *gyrA* и *parC* определяли с помощью метода ПЦР-РВ с эффектом гашения флуоресценции зонда праймером [12]. Дизайн флуоресцентно-меченых зондов (табл. 1) обеспечивал возможность выявления последовательностей ДНК *C. trachomatis* «дикого типа» и любых мутаций в участках, соответствующих кодомам 81–87 *gyrA* и 80–85 *parC* (нумерация *Escherichia coli*), путем анализа кривых плавления зондов непосредственно после проведения амплификации. Амплификацию и анализ кривых плавления зондов проводили по методике, описанной ранее [17].

В качестве контрольной ДНК использовали препарат, выделенный из *C. trachomatis* (серовар L2) с последовательностями QRDR *gyrA* и *parC* «дикого типа».

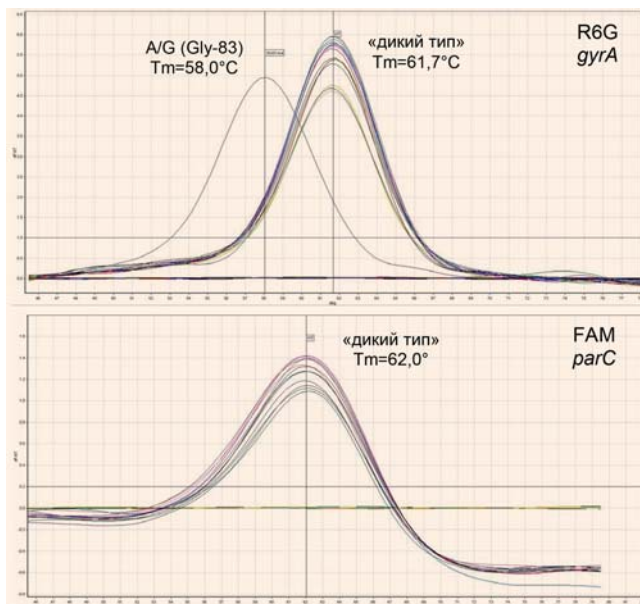
Секвенирование QRDR *gyrA* *C. trachomatis*. При выявлении с помощью ПЦР-РВ отличной от контрольного образца температуры плавления зонда, свидетельствующей о наличии мутаций в области кодонов 81–87 *gyrA*, внутренний фрагмент *gyrA* длиной 336 п.н., включающий всю область QRDR, исследовали путем дополнительной амплификации и секвенирования с внешними праймерами (табл. 1). Секвенирование проводили с помощью наборов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и генетического анализатора ABI Prism® 310 (Applied Biosystems, США).

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры и зонды для выявления и характеристики мутаций в QRDR генов *gyrA* и *parC*

Праймер/зонд	Последовательность, 3'→5'	Концентрация, мкМ
ПЦР-РВ		
CTR_ <i>gyrA</i> _Rpm	ATCCTGTGCCAGCCTTACTAAAGT	0,2
CTR_ <i>gyrA</i> _Fpm	ATACTTCCGGAGATTA(T-BHQ1)CACCC	0,8
CTR_ <i>gyrA</i> _Pb	AAAGTAGGATAAATGACACTTTCTCC-R6G	0,2
CTR_ <i>parC</i> _Rpm	TTTATTTGCCAAACGACAAGA	0,2
CTR_ <i>parC</i> _Fpm	GCTGCACCTGCATGG(T-BHQ1)GAT	0,8
CTR_ <i>parC</i> _Pb	AGCTTCCACGATAGGCGC-FAM	0,2
ПЦР и секвенирование		
CTR_ <i>gyrA</i> _SeqF	ATTAACCTTCTCAGCGACG	0,2
CTR_ <i>gyrA</i> _SeqR	GTTTCATCGTAGTTAGGACCA	0,2

* FAM – карбоксифлуоресцеин, R6G – 6-карбоксиродамин, BHQ1 – темновой гаситель флуоресценции 1 (black hole quencher 1).

Рисунок 1. Пример анализа QDRR *gyrA* и *parC* *C. trachomatis* с помощью анализа кривых плавления зондов после проведения ПЦР-ПВ



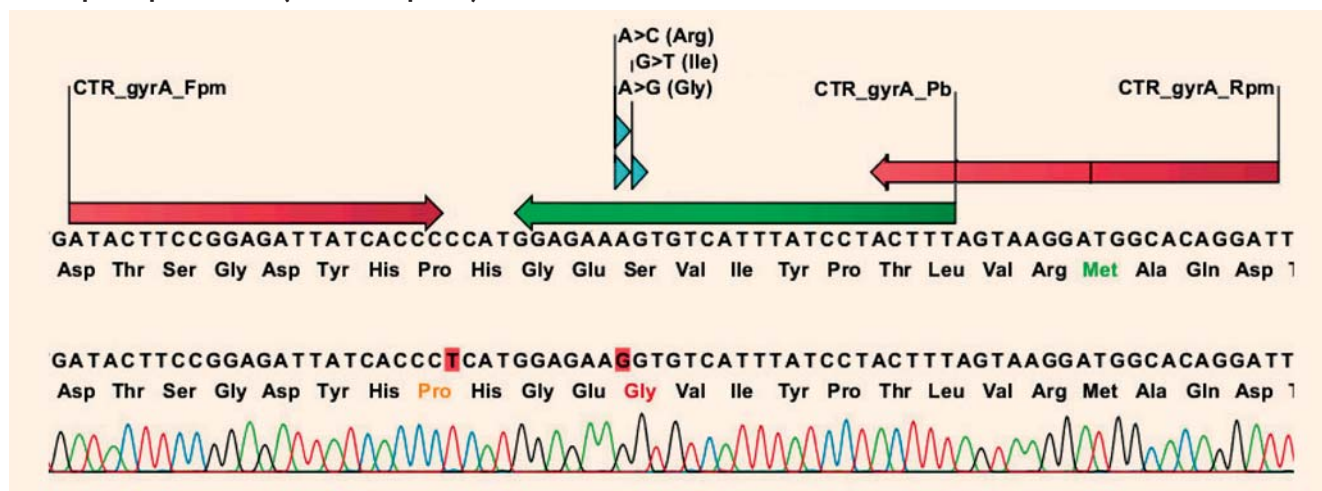
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

ПЦР-ПВ для детекции мутаций в QDRR *gyrA* и *parC* *C. trachomatis*. Используемая в данном исследовании технология ПЦР-ПВ обеспечивает возможность выявления различных (как известных, так и неизвестных) мутаций в области связывания олигонуклеотидных зондов и основана на эффекте переноса энергии флуоресценции между зондом и одним из праймеров [12]. В соответствии с описанным ранее дизайном, мутации в участках QDRR *gyrA* и *parC* могут быть выявлены с помощью постаmplификационного анализа кривых плавления зондов: образ-

цы, несущие мутации в области связывания зонда, характеризуются сниженной аффинностью и, соответственно, меньшей температурой плавления (T_m) зонда.

Скрининг клинических образцов на наличие мутаций в QDRR *gyrA* и *parC*. В исследование было включено 1 863 клинических образца, положительных на наличие ДНК *C. trachomatis* по результатам первичного скрининга, и 200 отрицательных образцов (контроль специфичности). Все образцы были проанализированы на наличие мутаций в QDRR *gyrA* и *parC* с использованием описанной выше технологии. Пример анализа мутаций в QDRR *gyrA* и *parC* *C. trachomatis* с помощью ПЦР-ПВ и анализа кривых плавления зондов представлен на рисунке 1. Специфические последовательности *gyrA* и *parC* *C. trachomatis* были выявлены, соответственно, в 1 841 и 1 839 положительных образцах (относительная чувствительность 99,8 и 98,7%), но ни в одном из отрицательных образцов (специфичность 100%). При этом следует отметить высокую чувствительность выявления хромосомных локусов *gyrA* и *parC*, несмотря на их менее высокую копиюность по сравнению с криптоической плазмидой *C. trachomatis*, которая является мишенью коммерческих диагностических систем [13]. Скрининг не выявил значимых мутаций в QDRR *parC* ни в одном образце. Все образцы имели профиль плавления зонда CTR_*parC*_Pb, идентичный «дикому типу». Факт отсутствия мутаций в *parC* клинических штаммов *C. trachomatis* является в достаточной степени ожидаемым, поскольку топоизомераза IV является вторичной мишенью ФХ у всех грамотрицательных бактерий, и мутации в области QDRR *parC* встречаются реже по сравнению с QDRR *gyrA* у различных видов данной группы [14]. В то же время у этой группы микроорганизмов наибольшее сродство ФХ проявляют к ДНК-гиразе, благодаря чему именно этот фермент является первичной мишенью их действия. ФХ, обладающие приблизительно одинаковым сродством к обоим топоизомеразам, в наименьшей степени способствуют селекции устойчивости. Это связано

Рисунок 2. Фрагмент нуклеотидной последовательности QDRR *gyrA* *C. trachomatis* «дикого типа» (сверху) и соответствующей мутантной последовательности (внизу) с указанием позиций нуклеотидных замен, а также участков связывания праймеров и зонда (цветные стрелки)



с тем, что для формирования устойчивого штамма мутации должны произойти одновременно в генах обоих ферментов, вероятность же двойных мутаций существенно ниже, чем одиночных.

ФХ, обладающие приблизительно одинаковым родством к обеим топоизомеразам, в наименьшей степени способствуют селекции устойчивости. Это связано с тем, что для формирования устойчивого штамма мутации должны произойти одновременно в генах обоих ферментов, вероятность же двойных мутаций существенно ниже, чем одиночных

Во всех, за исключением одного образца, были также обнаружены последовательности QRDR *gyrA* «дикого типа» в соответствии с профилем плавления зонда CTR_*gyrA*_Pb. Единственный образец продемонстрировал характерное снижение температуры плавления зонда (DTm = 3,7 °C), свидетельствующее о наличии мутации в QRDR *gyrA* (рис. 1).

Последующий анализ с использованием секвенирования подтвердил наличие однонуклеотидной транзиции A/G в области связывания зонда, которая соответствует аминокислотной замене Ser-83/Gly в QRDR *GyrA* (рис. 2). Известно, что данная мутация приводит к нарушению связывания ФХ с ДНК-гиразой и тем самым к формированию устойчивости к препаратам данной группы у различных видов грамотрицательных бактерий. В частности, замены аминокислотного остатка в позиции

83 *GyrA*, включая Gly-83, широко распространены у ФХ-резистентных штаммов энтеробактерий (*E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter* spp., и др.). Во многих исследованиях показана четкая корреляция между наличием замен в позициях 83 и 87 *GyrA* и повышенным уровнем устойчивости к ФХ [15, 16]. Более того, в исследовании Dessus-Babus et al. культивирование штаммов *C. trachomatis* *in vitro* в присутствии субингибирующих концентраций офлоксацина и ципрофлоксацина приводило к селекции мутантов с аминокислотными заменами именно в позиции 83 *GyrA*, которые обуславливали повышение минимальных подавляющих концентраций ФХ в 256 и более раз [14]. Таким образом, роль замены Ser-83/Gly в QRDR *GyrA* в формировании устойчивости *C. trachomatis* к ФХ является однозначно установленной.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе проведенного молекулярно-генетического скрининга большой коллекции урогенитальных образцов, содержащих ДНК *C. trachomatis*, нами был выявлен единственный случай наличия типичной мутации в QRDR *gyrA*, связанной со снижением чувствительности к ФХ. Таким образом, полученные данные свидетельствуют о возможности формирования «классических» механизмов устойчивости к ФХ у *C. trachomatis*, встречающихся у других видов грамотрицательных бактерий. Вместе с тем следует отметить крайне низкую (0,05%) частоту встречаемости подобного механизма устойчивости в исследованной популяции штаммов *C. trachomatis* – возбудителей инфекций урогенитального тракта.



ЛИТЕРАТУРА

- Somani J, Bhullar VB, Workowski KA, Farshy CE, Black CM. Multiple drug-resistant *Chlamydia trachomatis* associated with clinical treatment failure. *J Infect Dis*, 2000, 181: 1421-1427.
- Morrissey I, Salman H, Bakker S, Farrell D, Bebear CM, Ridgway G. Serial passage of *Chlamydia* spp. in sub-inhibitory fluoroquinolone concentrations. *J Antimicrob Chemother*, 2002, 49: 757-761.
- Лазарев В.Н., Говорун В.М., Савичева А.М. Анализ точечных мутаций в генах *ugeD*, *gyrA* и *parC* клинических изолятов *Chlamydia trachomatis*, устойчивых к фторхинолонам. *Молекулярная генетика, микробиология и вирусология*, 2004, (3): 3-7.
- Мисюрин О.Ю. Дисс.канд. биол. наук. Молекулярно-генетические особенности клинических изолятов *Chlamydia trachomatis*, *in vitro* устойчивых к фторхинолонам или макролидам. М., 2002. 73.
- Шипицина Е.В., Савичева А.М., Хуснутдинова Т.А. Устойчивость *Chlamydia trachomatis* к антибиотикам *in vitro*: методологические аспекты и клиническое значение. *Клин Микробиол Антимикроб Химиотер*, 2004, 6(1): 54-64.
- Shkarupeta MM, Lazarev VN, Akopian TA, et al. Analysis of antibiotic resistance markers in *Chlamydia trachomatis* clinical isolates obtained after ineffective antibiotic therapy. *Bull Exp Biol Med*, 2007, 143: 713-7.
- Николаева О.Ю. Дисс.канд. биол. наук. Резистентность к терапии урогенитального хламидиоза: механизмы устойчивости к антибактериальным препаратам. М., 2004. 83.
- Holmes K, Sparling P, Stamm W et al. Sexually Transmitted Diseases. 4-th ed. McGraw-Hill Medical, 2008.
- Lorian V, Ed. Antibiotics in laboratory medicine. 5-th ed. Williams & Wilkins, Baltimore, 2005.
- Ridgway GL, Bebear C, Bebear CM, Felmingham D, et al. Sub-committee on Susceptibility Testing of Intracellular and Cell-associated Pathogens of the European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST) of the European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ESCMID). Antimicrobial susceptibility testing of intracellular and cell-associated pathogens. EUCAST discussion document E.Dis 6.1 March 2001. *Clin. Microbiol. Infect.*, 2001, 7(12): 1-10.
- Suchland RJ, Geisler WM, Stamm WE. Methodologies and cell lines used for antimicrobial susceptibility testing of *Chlamydia* spp. *Antimicrob Agents Chemother*, 2003, 47(2): 636-42.
- Эйдельштейн М.В., Алексеев Я.И., Романов А.В. и др. Способ детекции специфических нуклеотидных последовательностей и нуклеотидных замен с помощью ПЦР в режиме реального времени с эффектом гашения флуоресценции зонда праймером. Патент на изобретение №RU 2451086.
- Lee SH, Vigliotti VS, Pappu S. DNA sequencing validation of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* nucleic acid tests. *Am J Clin Pathol*, 2008, 129: 852-859.
- Dessus-Babus S, Bebear CM, Charron A, Bebear C & de Barbeyrac B. Sequencing of gyrase and topoisomerase IV quinolone-resistance-determining regions of *Chlamydia trachomatis* and characterization of quinolone-resistant mutants obtained *in vitro*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1998, 42: 2474-2481.
- Nakata K, Maeda H, Fujii A, Arakawa S, Umezumi K, Kamidono S. In vitro and in vivo activities of sparfloxacin, other quinolones, and tetracyclines against *Chlamydia trachomatis*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1992, 36: 188-90.
- Yoshida H, Bogaki M, Nakamura M, Yamanaka LM, Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother*, 1991, 35: 1647-50.
- Эйдельштейн И.А., Эйдельштейн М.В., Шипицина Е.В., Хуснутдинова Т.А., Савичева А.М., Козлов Р.С. Оценка распространенности «классических» механизмов устойчивости к фторхинолонам у *Chlamydia trachomatis* связанных с мутациями в генах топоизомераз. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*, 2014, 4(16).