

Оценка распространенности «классических» механизмов устойчивости к фторхинолонам у *Chlamydia trachomatis*, связанных с мутациями в генах топоизомераз

И.А. Эйдельштейн¹, М.В. Эйдельштейн¹, Е.В. Шипицына²,
Т.А. Хуснутдинова², А.М. Савичева², Р.С. Козлов¹

¹ НИИ антимикробной химиотерапии ГБОУ ВПО СГМА Минздрава России, Смоленск, Россия

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

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 России ФХ широко используются и доступны в аптечной сети без рецепта, что потенциально оказывает селективное давление на развитие устойчивости к ним у различных видов возбудителей, включая возбудителей инфекций, передающихся половым путем. С помощью ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ) 1572 клинических образца, полученных от пациентов с инфекциями урогенитального тракта, содержащих ДНК *C. trachomatis*, а также 200 отрицательных клинических образцов (контроль специфичности)

были исследованы на наличие любых мутаций в QRDR участках генов-мишеней: *gyrA* и *parC* *C. trachomatis*, способных вызывать снижение чувствительности к ФХ. В единственном образце анализ с использованием ПЦР-РВ и последующего секвенирования выявил наличие однонуклеотидной транзиции А/Г в области связывания ПЦР-зонда, которая соответствует аминокислотной замене Ser-83/Gly в QRDR *GyrA*. Таким образом, впервые выявлено наличие типичной мутации устойчивости к ФХ в QRDR *gyrA* в клиническом штамме *C. trachomatis*. Проведенное исследование 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.

Evaluation of Prevalence of Classical Fluoroquinolone Resistance Mechanisms in *Chlamydia trachomatis* Due to Mutations in the Topoisomerase Genes

I.A. Edelstein¹, M.V. Edelstein¹, E.V. Shipitsyna², T.A. Khusnutdinova², A.M. Savicheva², R.S. Kozlov¹

¹ Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk, Russia

² D. O. Ott Research Institute of Obstetrics and Gynecology, St. Petersburg, Russia

Until now, mutational resistance to fluoroquinolones (FQs) that represent a second-line treatment option for chlamydial infections after macrolides and tetracyclines

has not been described in clinical isolates of *C. trachomatis*. However, a possibility of selection of FQ resistance via mutations in the primary target gene, *gyrA*, has been demonstrated *in vitro* with *C. trachomatis* strains. In Russia, FQs are used widely and available over-the-counter thus potentially exerting significant selective pressure

Контактный адрес:

Инна Александровна Эйдельштейн

Эл. почта: ie@antibiotic.ru

for resistance development in STI pathogens. This study aimed to assess the presence of any FQ resistance mutations in *quinolone resistance determining regions* (QRDRs) of the *C. trachomatis gyrA* and *parC* genes directly in clinical samples using a newly developed real-time PCR assay. A total of 1572 *C. trachomatis*-positive clinical samples, obtained from patients with various urogenital tract infections, and 200 negative samples (used for control of assay specificity) were screened. A single sample revealed the presence of an A/G nucleotide transition in the PCR probe binding site corresponding to the

Ser-83/Gly amino acid substitution of in the GyrA QRDR which was confirmed by re-amplification and direct DNA sequencing. We, therefore, report for the first time the identification of a typical FQ resistance mutation in the *C. trachomatis gyrA* gene from a clinical sample. Results of our study, however, demonstrate that the «classical» resistance mechanisms to FQ are rare in the studied population of *C. trachomatis*.

Key words: fluoroquinolones, QRDR, *Chlamydia trachomatis*, mutation, topoisomerase, GyrA.

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).

Азалиды (азитромицин) и тетрациклины (доксциклин) 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 антибиотиков), особенно в урологической практике. Широкое применение ФХ, тем самым, 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), 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, описаны не были.

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 исследования *in vitro* чувствительности к ФХ клинических изолятов (выделенных у пациентов при неэффективной 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 мишени 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].

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, 9, 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*) у *C. trachomatis* нами была разработана методика на основе ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ), которая может быть использована как скрининговый подход для мониторинга возможных механизмов резистентности к фторхинолонам.

Целью данного исследования явилось выявление мутаций устойчивости к фторхинолонам в QRDR генов-мишеней (*gyrA* и *parC*) *C. trachomatis*.

Материал и методы

Клинические образцы. В исследование было включено 1572 клинических образца (соскобы из цервикального канала женщин и уретры мужчин), полученных в 2009–2011 гг., от пациентов с инфекциями урогенитального тракта различной локализации. Материал был получен из лаборатории микробиологии ФГБУ «НИИ акушерства и гинекологии им. Д. О. Отта» СЗО РАМН (Санкт-Петербург) и лаборатории НИИ антимикробной химиотерапии ГБОУ ВПО «Смоленская государственная медицинская академия» Минздрава России (Смоленск), где осуществлялся предварительный скрининг образцов на наличие ДНК *C. trachomatis* с использованием коммерческой тест-системы «АмплиСенс® *Chlamydia trachomatis*-FL» (ООО

«ИнтерЛабСервис», Россия) на основе технологии ПЦР-РВ. Выделение ДНК проводили сорбционным методом с применением набора «ДНК-сорб-АМ» (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия). Очищенную ДНК хранили при –70 °С до момента анализа.

ПЦР-РВ 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 флуоресцентномеченных зондов (таблица) 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.

Состав ПЦР смеси общим объемом 25 мкл включал: олигонуклеотидные праймеры и зонды (ЗАО «Синтол», Россия) в концентрации, указанной в таблице; 0,2 мМ дНТФ; 2 мМ MgCl₂; 2,5 ед. TaqF ДНК-полимеразы; 1х ПЦР буфер (ООО «ИнтерЛабСервис», Россия) и 3 мкл образца ДНК.

Амплификацию и анализ кривых плавления зондов проводили с помощью системы Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) согласно следующему протоколу: начальная инкубация 15 мин. при 95 °С; денатурация 1 мин. при 95 °С; затем 55 циклов денатурации 15 с при 95 °С и 15 с отжига-элонгации при 58 °С с детекцией флуоресценции на каналах FAM и JOE (R6G); анализ кривых плавления с начальной инкубацией в течение 3 мин. при 45 °С и последующим повышением температуры на 1 °С каждые 10 с до 85 °С с детекцией флуоресценции на каналах FAM и JOE (R6G).

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_gyrA_Rpm	ATCCTGTGCCAGCCTTACTAAAAGT	0,2
CTR_gyrA_Fpm	ATACTTCCGGAGATTA (T-BHQ1) CACCC	0,8
CTR_gyrA_Pb	AAAGTAGGATAAATGACACTTCTCC-R6G	0,2
CTR_parC_Rpm	TTTATTTGCCAAAACGACAAGA	0,2
CTR_parC_Fpm	GCTGCACCTGCATGG (T-BHQ1) GAT	0,8
CTR_parC_Pb	AGCTTCCACGATAGGCGC-FAM	0,2
ПЦР и секвенирование		
CTR_gyrA_SeqF	ATTAAAACCTTCTCAGCGACG	0,2
CTR_gyrA_SeqR	GTTTCATCGTAGTTAGGGACCA	0,2

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

Идентификацию последовательностей «дикого типа» и мутаций в QRDR *gyrA* и *parC* проводили в соответствии с температурой плавления зондов. 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 ПЦП-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 (см. таблицу). Секвенирование проводили с помощью наборов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и генетического анализатора ABI Prism® 310 (Applied Biosystems, США).

Результаты исследования и обсуждение

Дизайн ПЦП-РВ для детекции мутаций в QRDR *gyrA* и *parC* *C. trachomatis*. Используемая в данном исследовании технология ПЦП-РВ 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]. При этом для амплификации каждого из целевых участков нуклеотидных последовательностей QRDR *gyrA* и *parC* *C. trachomatis* были разработаны соответствующие пары праймеров, в которых один из олигонуклеотидов служит для образования цепи ДНК, комплементарной зонду, и содержит внутренний нефлуоресцирующий (темновой) гаситель флуоресценции (BHQ), а для детекции целевых нуклеотидных последовательностей, находящихся между участками связывания праймеров, использованы 3'-флуоресцентномеченные зонды, участки связывания которых совпадают с областями QRDR и находятся на расстоянии нескольких нуклеотидов от 3'-концов соответствующих праймеров, несущих гасители флуоресценции. Таким образом, связывание зондов с цепями ДНК, образованными в результате элонгации праймеров, приводит к сближению флуорофора и гасителя на расстояние, достаточное для эффективного гашения флуоресценции за счет резонансного переноса энергии флуоресценции (FRET) или образования стабильных комплексов между флуорофором и гасителем (статическое или контактное гашение). В соответствии с описанным выше дизайном, мутации в участках QRDR *gyrA* и *parC* могут быть выявлены

с помощью постаплификационного анализа кривых плавления зондов: образцы, несущие мутации в области связывания зонда, характеризуются сниженной аффинностью и соответственно меньшей температурой плавления (T_m) зонда.

Скрининг клинических образцов на наличие мутаций в QRDR *gyrA* и *parC*. В исследование было включено 1572 клинических образца, положительных на наличие ДНК *C. trachomatis* по результатам первичного скрининга с использованием коммерческой тест-системы «АмплиСенс® *Chlamydia trachomatis*-FL» и 200 отрицательных образцов (контроль специфичности). Все образцы были проанализированы на наличие мутаций в QRDR *gyrA* и *parC* с использованием описанной выше технологии. Пример анализа мутаций в QRDR *gyrA* и *parC* у *C. trachomatis* с помощью ПЦП-РВ и анализа кривых плавления зондов представлен на рис. 1. Специфические последовательности *gyrA* и *parC* у *C. trachomatis* были выявлены соответственно в 1566 и 1564 положительных образцах (относительная чувствительность 99,6 и 99,5%), 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 копияность по сравнению с криптической плазмидой *C. trachomatis*, которая является мишенью коммерческих диагностических систем [13]. Скрининг не выявил значимых мутаций в QRDR *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 QRDR *parC* встречаются реже по сравнению с QRDR *gyrA* у различных видов данной группы [14].

Во всех образцах, за исключением одного, 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 ($\Delta T_m = 3,7^\circ\text{C}$), свидетельствующее о наличии мутации в QRDR *gyrA* (см. 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

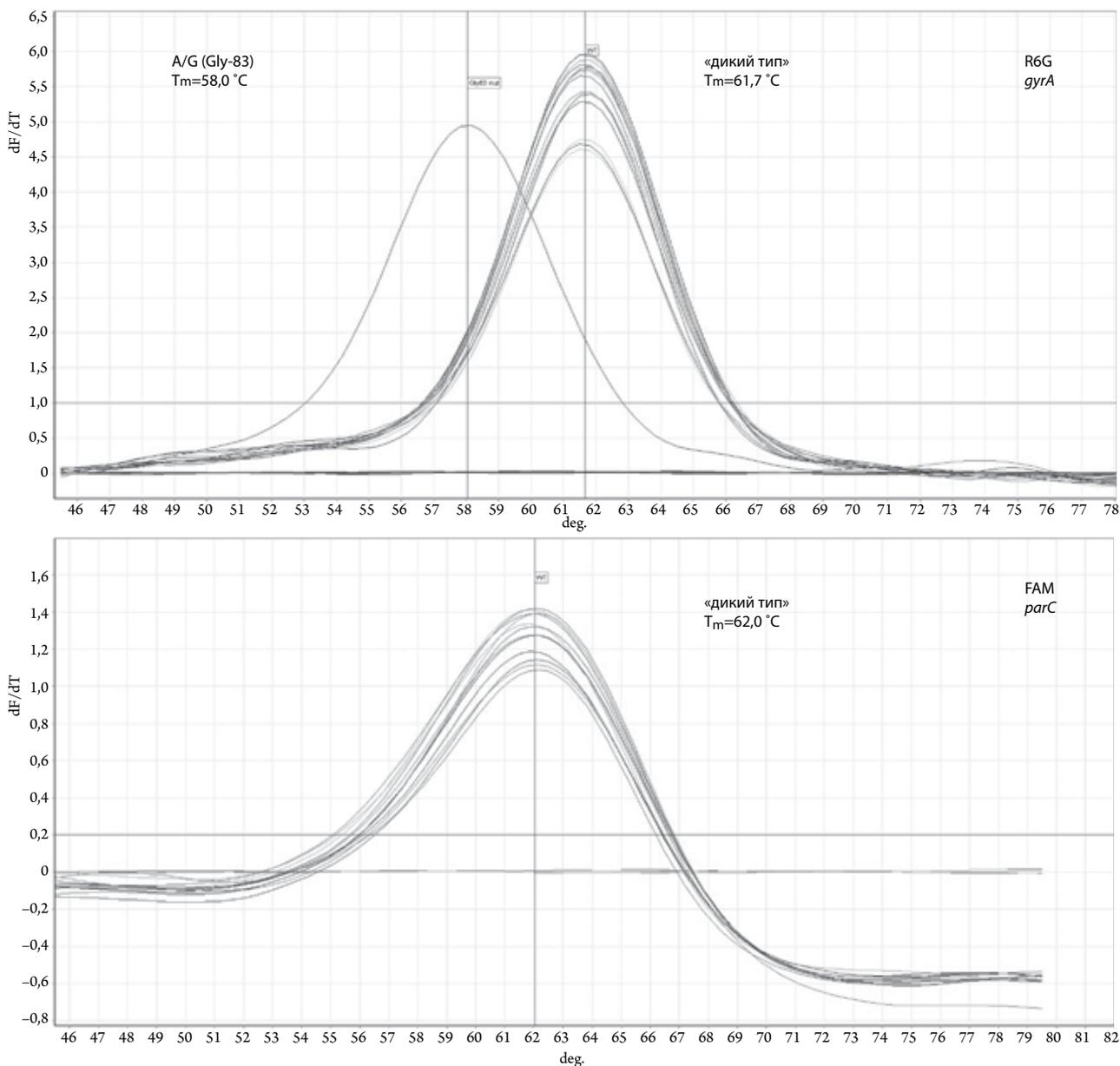


Рис. 1. Пример анализа QRDR *gyrA* и *parC* у *C. trachomatis* с помощью анализа кривых плавления зондов после проведения ПЦР-РВ.

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 (*Escherichia 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 S. Dessus-Babus, et al. [14] культивирование штаммов *C. trachomatis in vitro* в присутствии субингиби-

рующих 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. 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

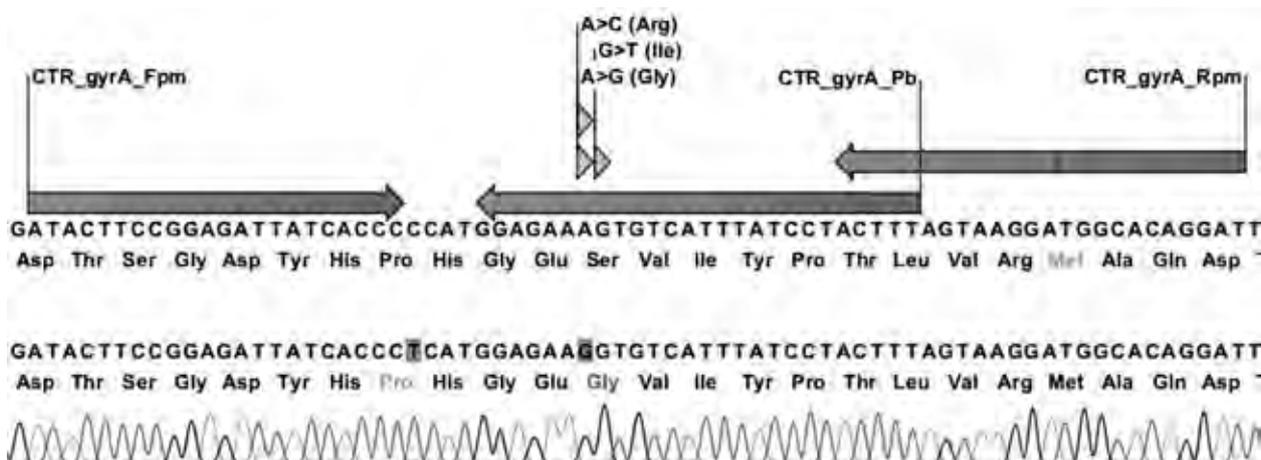


Рис. 2. Фрагмент нуклеотидной последовательности QRDR *gyrA* у *C. trachomatis* «дикого типа» (сверху) и соответствующей мутантной последовательности (внизу) с указанием позиций нуклеотидных замен, а также участков связывания праймеров и зонда (серые стрелки).

образцов, содержащих ДНК *C. trachomatis*, нами впервые выявлен 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 (<0,07%)

частоту встречаемости подобного механизма устойчивости в исследованной популяции штаммов *C. trachomatis* — возбудителей инфекций мочеполовой системы. Разработанный нами подход может быть использован для быстрого выявления мутаций и прогнозирования возможной устойчивости *C. trachomatis* к антибиотикам фторхинолонового ряда.

Литература

- Somani J., Bhullar V.B., Workowski K.A., Farshy C.E., Black C.M. Multiple drug-resistant *Chlamydia trachomatis* associated with clinical treatment failure. *J Infect Dis* 2000; 181:1421-7.
- Morrissey I., Salman H., Bakker S., Farrell D., Bebear C.M., Ridgway G. Serial passage of *Chlamydia* spp. in sub-inhibitory fluoroquinolone concentrations. *J Antimicrob Chemother* 2002; 49:757-61.
- Лазарев В.Н., Говорун В.М., Савичева А.М. Анализ точечных мутаций в генах *ygeD*, *gyrA* и *parC* клинических изолятов *Chlamydia trachomatis*, устойчивых к фторхинолонам. Молекулярная генетика, микробиология и вирусология 2004; (3):3-7.
- Мисюрин О.Ю. Молекулярно-генетические особенности клинических изолятов *Chlamydia trachomatis*, *in vitro* устойчивых к фторхинолонам или макролидам. Дисс. канд. биол. наук. Москва; 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 M.M., Lazarev V.N., Akopian T.A., 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. Резистентность к терапии урогенитального хламидиоза: механизмы устойчивости к антибактериальным препаратам. Дисс. канд. биол. наук. Москва; 2004. 83 с.
- 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 & Willrins; Baltimore; 2005.
- Ridgway G.L., Bebear C., Bebear C.M., 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 R.J., Geisler W.M., Stamm W.E. Methodologies and cell lines used for antimicrobial susceptibility testing of *Chlamydia* spp. *Antimicrob Agents Chemother* 2003; 47 (2):636-42.

12. 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.
13. Lee S.H., Vigliotti V.S., Pappu S. DNA sequencing validation of *Chlamydia trachomatis* and *Neisseria gonorrhoeae* nucleic acid tests. *Am J Clin Pathol* 2008; 129:852-9.
14. Dessus-Babus S., Bebear C.M., 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; 42:2474-81.
15. Nakata K., Maeda H., Fujii A., Arakawa S., Umezu 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.
16. Yoshida H., Bogaki M, Nakamura M, Yamanaka L.M., Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:1647-50.