

УДК 615.779.90

РОЛЬ МУТАЦИЙ В ДНК-ГИРАЗЕ И ТОПОИЗОМЕРАЗЕ IV В УСТОЙЧИВОСТИ *STREPTOCOCCUS PNEUMONIAE* К ФТОРХИНОЛОНАМ

В.В. Федорчук, С.А. Грудина*, Л.А. Кротова*, Е.А. Черкашин, С.В. Сидоренко*,
В.И. Тишков

(Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, кафедра химической энзимологии; e-mail: vit@enz.chem.msu.ru)

Streptococcus pneumoniae является основным возбудителем внебольничной пневмонии, и одной из причин других серьезных заболеваний, таких как менингит, отит, синусит и обострения хронического бронхита. Широкое применение фторхинолонов в последние годы привело к появлению пневмококков с пониженной чувствительностью к этим антибиотикам. Действие фторхинолонов основано на ингибировании двух бактериальных топоизомераз – ДНК-гиразы (топоизомеразы II) и топоизомеразы IV. Основой формирования резистентности к хинолонам являются мутации (аминокислотные замены) в области хинолонового кармана. А соответствующие области генов *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE*, называют областями, определяющими устойчивость к хинолонам (QRDR – *quinolone resistance determining region*). Нами было изучено 190 штаммов *S. pneumoniae*, выделенных в московских клиниках у пациентов с инфекциями верхних и нижних дыхательных путей. Из них 12 штаммов обладали повышенной устойчивостью к фторхинолонам (ципрофлоксацин и офлоксацин). Фрагменты генов, определяющие устойчивость к хинолонам были выделены при помощи ПЦР из хромосомной ДНК, очищены и отсековенированы для определения мутаций, ответственных за появление устойчивости к хинолонам.

Streptococcus pneumoniae, будучи основным возбудителем внебольничной пневмонии [1], является также одной из причин других серьезных заболеваний, таких как менингит, отит, синусит и обострения хронического бронхита [2]. Появление пенициллин-резистентных и мульти-резистентных штаммов *S. pneumoniae* [3] привело к разработке противопневмококковых препаратов на основе фторированных хинолонов (фторхинолонов) [4,

5], которые используются теперь, как антибиотики первого ряда при лечении пневмонии. Широкое применение фторхинолонов в последние годы привело к появлению пневмококков с пониженной чувствительностью к этим антибиотикам [6, 7].

Действие фторхинолонов основано на ингибировании двух бактериальных топоизомераз – ДНК-гиразы (топоизомеразы II) и топоизомеразы IV. ДНК-гираза

* Государственный научный центр по антибиотикам, Москва.

Состав олигонуклеотидных праймеров, использованных для амплификации областей определяющих устойчивость к хинолонам [14]

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Размер*
gyrA	5'CCGTCGCATTCTCTACG-3'	5'-AGTTGCTCCATTAACCA-3'	382
gyrB	5'-TTCTCCGATTTCCCTCATG-3'	5'-AGAAGGGTACGAATGTGG-3'	458
parC	5'-TGGGTTGAAGCCGGTTCA-3'	5'-TGCTGGCAAGACCGTTGG-3'	367
parE	5'-AAGGCGCGTGATGAGAGC-3'	5'-TCTGCTCCAACACCCGCA-3'	290

Примечания. * Размер амплифицируемой области (пар оснований).

катализирует расплетение (отрицательную суперспирализацию) молекул ДНК, а топоизомераза IV участвует в разъединении (декатенации) ковалентно-замкнутых кольцевых молекул ДНК. Образование тройного комплекса ДНК–фермент–хинолон приводит к нарушению процесса репликации бактериальной ДНК и к гибели клетки. ДНК-гираза состоит из двух субъединиц типа А и двух типа В (соответствующие гены *gyrA* и *gyrB*) [8]. Топоизомераза IV состоит из двух субъединиц типа С и двух типа Е (соответствующие гены *parC* и *parE*) [9]. Участок полипептидной цепи этих ферментов, в котором происходит связывание хинолона, получил название хинолонового кармана.

Основой формирования резистентности к хинолонам являются аминокислотные замены в области хинолонового кармана. Области генов *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE*, в которых происходят эти мутации, называют областями, определяющими устойчивость к хинолонам (QRDR – *quinolone resistance determining region*) [7, 10]. Другой возможный механизм резистентности связан с мутациями в гене *poxA*, который кодирует мембранные белки, участвующие в активном выбросе (эффлюксе) фторхинолонов из клетки [11]. При некоторых из описанных мутаций в областях QRDR МПК (минимальная подавляющая концентрация) повышается в 2–4 раза, при других – более чем в 100 раз. Обычно единичные мутации приводят к незначительному (в 2–4 раза) повышению МПК. Высокий уровень устойчивости обычно связан с двумя и более мутациями в одном или нескольких генах.

Поиск и изучение мутаций, ответственных за возникновение антибиотикорезистентности помимо теоретического имеют также огромное практическое значение. Быстрое определение антибиотикорезистентности клинических штаммов микроорганизмов часто является критическим фактором для выбора оптимального лечения пациентов. Методы поиска генов и мутаций, основанные на анализе ДНК, часто гораздо быстрее и точнее классических методов определения резистентности [12]. Это особенно важно в случае медленно растущих или некультивируемых микроорганизмов.

Экспериментальная часть

Исследуемые штаммы *S. pneumoniae* культивировали на агаре “Columbia CNA” (США) с добавлением 5% овечьей крови в течение 24 ч при 37°. МПК (минимальную подавляющую концентрацию) определяли методом двукратных серийных микроразведений с использованием 96 луночных планшетов в соответствии с методикой, рекомендованной NCCLS¹ (США) [13].

Отдельную колонию каждого штамма ресуспендировали в 200 мкл воды, инкубировали в течение 5 мин при 95° и центрифугировали (10 000 об/мин, 5 мин). ДНК, находящуюся в надосадочной жидкости, использовали в качестве матрицы для ПЦР. Амплификацию проводили в общем объеме 25 мкл в тонкостенных пробирках, содержащих 60 мМ Tris-HCl (pH 8,5 при 25°), 1,5 мМ MgCl₂, 25 мМ KCl, 10 мМ (NH₄)₂SO₄, 10 мМ 2-меркаптоэтанол, 0,1% Тритон X-100, 100 мкМ каждого дНТФ, 1 мкМ каждого олигонуклеотидного праймера. Состав праймеров приведен в табл. 1. Реакции проводили в ДНК-амплификаторе PHC-2 (Techne, Великобритания) по следующей схеме: начальная денатурация в течение 2 мин при 95°, затем 30 циклов: денатурация 1 мин при 95°, отжиг 1 мин при 53°, элонгация 2 мин при 72°, завершающий этап элонгации 10 мин при 72°. Очистку продукта ПЦР от избытка праймеров проводили путем осаждения ДНК 70%-м этанолом в присутствии 750 мМ ацетата аммония. Смесь инкубировали в течение 30 мин во льду, центрифугировали 10 мин при 10 000 об/мин и 4°. Надосадочную жидкость сливали, а осадок высушивали на воздухе и растворяли в требуемом количестве воды.

Секвенирование ДНК по обеим цепям проводили ферментативным методом [15] на автоматическом ДНК-секвенаторе ABI 370A фирмы “Applied Biosystems” (США) с использованием наборов для секвенирования ABI Prizm и согласно рекомендациям фирмы-производителя.

Результаты и их обсуждение

В ходе исследования были изучены 190 штаммов *S. pneumoniae*, выделенные у амбулаторных пациентов

Т а б л и ц а 2

Минимальные подавляющие концентрации антибиотиков и мутации, найденные в областях, определяющих устойчивость к хинолонам

Штамм	МПК, мг/л						Мутации			
	CIP	OFX	MXF	PEN	CTX	ERY	gyrA	gyrB	parC	parE
10	4	4	0,125	0,03	0,015	0,015	–	–	–	I460V
120	4	4	0,25	0,25	0,5	0,125	–	–	–	–
131	4	4	0,25	0,015	0,004	0,015	–	–	–	–
162	4	4	0,25	0,25	0,004	0,125	–	–	K137N	I460V
217	4	4	0,25	0,06	0,008	0,06	–	–	–	I460V
282	8	4	0,25	0,03	0,03	0,03	–	–	–	I460V
307	4	4	0,06	0,125	0,06	0,015	S114G	–	S52G N91D	–
559	4/8	4	0,25	0,03	0,008	0,03	–	–	K137N	I460V
663	4	4	0,25	0,06	0,015	0,015	–	–	–	–
674	4	4	0,06	0,5	2	0,5	–	–	–	I460V
780	4	4	0,25	0,25	0,5	0,25	–	–	–	I460V
830	4	4	0,25	0,5	2	0,5	–	–	–	I460V
Чувствительный штамм*	<2	<2	<1	<0,06	<0,5	<0,25	–	–	–	–

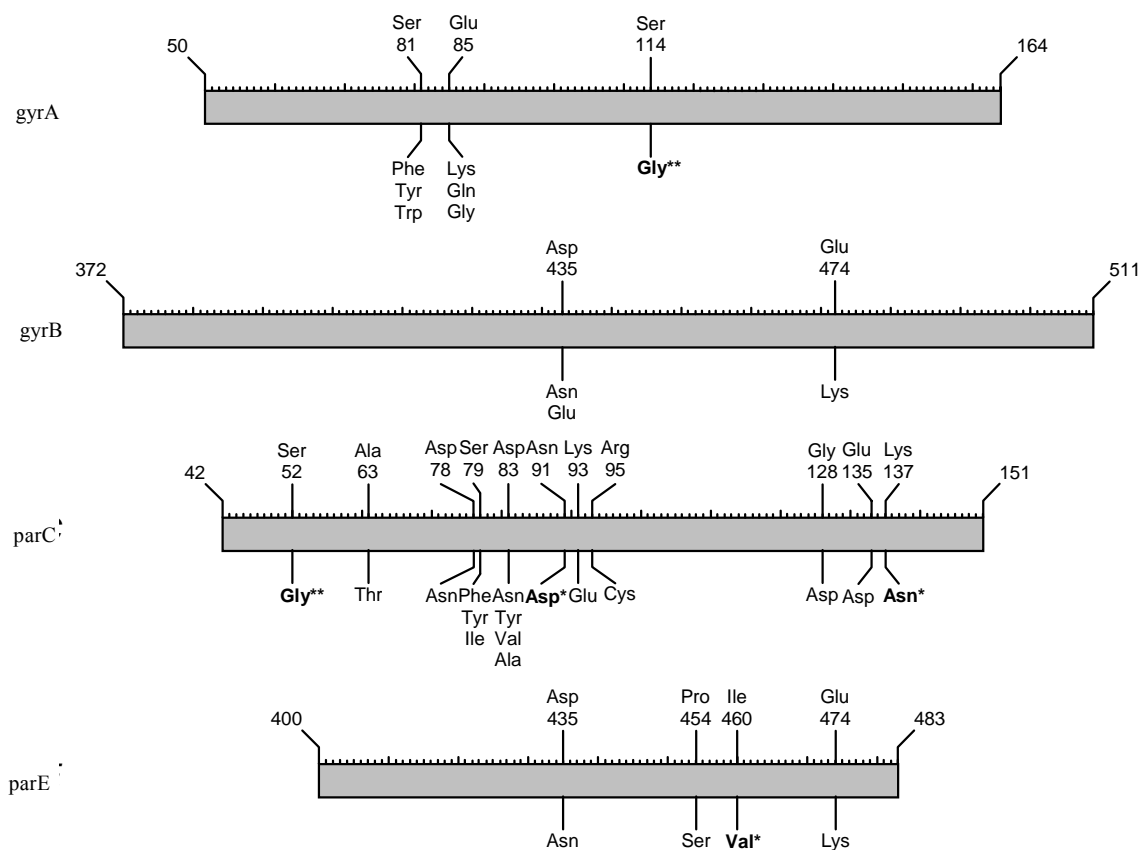
Примечания. CIP – ципрофлоксацин, OFX – офлоксацин, MXF – моксифлоксацин, PEN – бензилпенициллин, CTX – цефотаксим, ERY – эритромицин. * МПК чувствительного штамма *S. pneumoniae* по рекомендации NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards, USA) [13].

с инфекциями верхних и нижних дыхательных путей в 12 стационарах г. Москвы с 1998 по 2001 г. Была определена их чувствительность к различным классам антибиотиков: фторхинолонам (ципрофлоксацин, офлоксацин и моксифлоксацин), β -лактамам пенициллинам (бензилпенициллин) и цефалоспорином (цефотаксим), макролидам (эритромицин). Были отобраны 12 штаммов, обладающих повышенной устойчивостью к ципрофлоксацину и офлоксацину. Области, определяющие устойчивость к хинолонам, были выделены при помощи ПЦР из хромосомной ДНК, очищены и отсекурованы. МПК перечисленных выше антибиотиков и мутации, найденные в областях, определяющих устойчивость к хинолонам, представлены в табл. 2.

На рисунке представлены типичные мутации, обнаруженные в хинолон-резистентных штаммах *S. pneumoniae*, а также мутации обнаруженные в этой работе. В 6 из 12 изученных штаммов была обнаружена аминокислотная замена Ile460Val в гене parE. Ранее

было показано, что сама по себе эта мутация не приводит к появлению у *S. pneumoniae* устойчивости к хинолонам [16], однако она часто встречается у устойчивых штаммов и ее роль до сих пор не ясна. В 2 штаммах найдены две аминокислотные замены: Ile460Val в гене parE и Lys137Asn в гене parC. В одном штамме было найдено 3 мутации: Ser52Gly и Asn91Asp в гене parC и Ser114Gly в гене gyrA. Следует отметить, что 2 из найденных мутаций (Ser52Gly в гене parC и Ser114Gly в гене gyrA) не являются типичными, и для выяснения их роли необходимы дальнейшие эксперименты. В 3 штаммах ни в одном из генов (gyrA, gyrB, parC или parE) не было обнаружено ни одной мутации в областях, определяющих устойчивость к хинолонам.

В случае штаммов 120, 674 и 830, в которых не обнаружено значащих мутаций в областях, определяющих устойчивость к хинолонам, можно предположить наличие механизма активного выброса антибиотика из



Схематическое изображение известных мутаций в генах *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE* в областях, определяющих устойчивость к хинолонам (* мутации, найденные в данной работе; ** мутации, впервые найденные в данной работе)

клетки, поскольку данные штаммы обладают также значительной устойчивостью к большинству представленных антибиотиков (за исключением моксифлоксацина).

Полученные результаты будут использованы для разработки экспресс-метода определения устойчивости *S. pneumoniae* к хинолонам на основе ДНК-чипов.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 02-04-49360).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bartlett J.G., Grundy L.M. // *New Engl. J. Med.* 1995. **333**. P. 1618.
2. Finch R.G. // *Drugs.* 1995. **49**. P. 144.
3. Klugman K.P. // *Clin. Micro-biol. Rev.* 1990. **3**. P. 171.
4. Eliopoulos G.M. // *Drugs.* 1995. **49**. P. 48.
5. Piddock L.J.V. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994. **38**. P. 163.
6. Chen D.K., McGeer A., de Azavedo J.C., Low D.E. // *New Engl. J. Med.* 1999. **341**. P. 233.
7. Jones M.E., Sahn D.F., Martin N. et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000. **44**. P. 462.
8. Roca J. // *Trends Biochem Sci.* 1995. **20**. P. 156.
9. Peng H, Marians K. // *J. Biol. Chem.* 1993. **268**. P. 24481.
10. Yoshida H., Bogaki M., Nakamura M., Nakamura S. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1990. **34**. P. 1271.
11. Hooper D. // *Drug Resistance Updates.* 1999. **2**. P. 38.
12. Fluit A.C., Visser M.R., Schmitz F.J. // *Clinical Microbiology Reviews.* 2001. **14**. P. 836.
13. Antimicrobial Susceptibility Testings; Eleventh Informational Supplement. // *The National Committee for Clinical Laboratory Standards.* 2001. 21.
14. Pan X.S., Ambler J., Mehtar S., Fisher L.M. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1996. **40**. P. 2321.
15. Sanger F, Nicklen S., Coulson A.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. **74**. P. 5463.
16. Pestova E., Beyer R., Cianciotto N.P. et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1999. **43**. P. 2000.

Поступила в редакцию 25.10.02