

АННОТАЦИЯ
диссертационной работы
Амирбековой Жанны
на тему:
**«ОЦЕНКА РАСПРОСТРАНЕННОСТИ УСТОЙЧИВОСТИ
C.TRACHOMATIS К ФТОРХИНОЛОНАМ НА ОСНОВЕ ИЗУЧЕНИЯ
МУТАЦИОННОГО ПРОФИЛЯ ГЕНОВ-МИШЕНЕЙ»**

на соискание степени доктора философии (PhD)
по специальности 6D110100 «Медицина»

Актуальность проблемы

Chlamydia trachomatis, являясь облигатным внутриклеточным бактериальным патогеном, относится к числу одних из самых распространенных возбудителей заболеваний, передающихся половым путем. Важной особенностью данной инфекции является тот факт, что примерно в 75% случаев для женщин и 50% случаев для мужчин данное заболевание протекает, как правило, бессимптомно [1. Sziller I., Witkin S.S., Ziegert M., 1998]. Данное обстоятельство обеспечивает распространение хламидийной инфекции в популяции человека, вследствие несвоевременного или отсутствия обращения людей за медицинской помощью в организации здравоохранения. Более того, без своевременного и адекватного диагностического подхода и терапии хламидийной инфекции, процесс может перейти в более верхние отделы урогенитального тракта, вызывая новые патологические процессы с тяжелыми последствиями, а также приобрести длительную хроническую инфекционную форму [2. Cohen C.R., Brunham R.C., 1999; 3. Paavonen J., Eggert-Kruse W., 1999].

Выбором препаратов при лечении урогенитальной хламидийной инфекции являются, как правило, макролиды, тетрациклины и препараты фторхинолонового ряда [4. Ridgway G.L., 1997]. В последнее время появляются сообщения о возникновении «неуспешной» противохламидийной антибиотикотерапии, которую иногда связывают с появлением резистентности *C.trachomatis* к антибиотикам [5. Somani J., Bhullar V.B., Workowski K.A., 2000]. В то же время, провести адекватную оценку уровня устойчивости хламидийного патогена к антибиотикам представляет собой крайне трудную задачу, которую сложно решить вследствие ряда объективных причин. Во-первых, проведение контроля излеченности при хламидийной инфекции не всегда выполняется специалистами здравоохранения. Во-вторых, получение информации по антибиотикограмме является крайне сложной задачей, так как хламидии очень сложно культивировать. В-третьих, порой сложно разделить выявленную хламидию после лечения (неэффективное лечение, отсутствие излеченности) от реинфекции, когда пациент вылечился на самом деле, но к моменту последующего осмотра снова инфицировался.

Проблема антибиотикорезистентности на данный момент является актуальной, и хламидийная инфекция не является тому исключением. Механизмы устойчивости активно изучаются, и к настоящему моменту многое уже известно. В то же время, существуют открытые вопросы в полном понимании возникновения и распространения генетических основ антибиотикорезистентности.

Следует понимать, что существуют особенности в жизненном цикле *C.trachomatis* - размножение и развитие хламидий происходит внутри клетки-хозяина. Нахождение активной части жизни во внутриклеточной среде создает сложности при простой экстраполяции понимания распространения генов устойчивости среди обычных грамотрицательных и грамположительных бактерий. Тем не менее, были получены фенотипически устойчивые штаммы *C.trachomatis* при культивировании на средах в присутствии антибиотиков в субингибирующих концентрациях.

На сегодняшний момент в литературе появляются данные о генетических механизмах возникновения устойчивости хламидий к различным антибактериальным препаратам. Так, например, анализ генов мутантных штаммов *C.trachomatis*, появившихся вследствие множественных пассажей в культуре клеток с антибиотиками, показал, что у мутантных изолятов существуют мутации в генах *gyrA* и *parC*, которые ассоциированы с устойчивостью к фторхинолонам [6. Yokoi S., Yasuda M., Ito S., 2004; 7. Misiurina O., Shipitsina E.V., Finashutina Iu P., 2004]. Данный механизм возникновения устойчивости к фторхинолонам вследствие мутаций в генах-мишенях, который, приводя к снижению сродства фторхинолонов и мишеней, может быть одним из основных. Тем не менее, на данном этапе существует достаточно мало данных об уровне мутационного профиля в клинических штаммах *C.trachomatis*.

Таким образом, сложилась ситуация, когда, с одной стороны, появляются сообщения о клиническом неуспешном лечении, а с другой стороны, существует недостаточное количество подтверждающих данных, связанных с молекулярно-генетическими механизмами развития устойчивости у хламидийной инфекции. Все это и предопределило поставить перед нами цель по оценке уровня резистентности хламидийной инфекции к фторхинолонам на основе изучения мутаций в генах-мишенях.

Цель исследования

Оценить уровень распространенности устойчивости хламидийной инфекции к фторхинолонам на основе изучения мутаций в QRDR-регионе *gyrA* и *parC* генов.

Задачи исследования

1. Изучить структуру ИППП и определить долю встречаемости *Chlamydia trachomatis* в гинекологической практике женщин;
2. Провести корреляционный анализ на определение факторов, ассоциированных с ИППП;

3. Проанализировать мутации в *gyrA* и *parC* генах QRDR регионе клинических изолятов *C.trachomatis*;
4. Провести биоинформатический анализ полногеномных данных глобальной коллекции *C.trachomatis* для эпидемиологической оценки устойчивости к фторхинолонам.

Научная новизна

Изучены поведенческие факторы, ассоциированные с хламидийной инфекцией на основе многофакторного анализа, показывающие роль раннего дебюта сексуальной жизни в ассоциации приобретения ИППП.

Впервые проведена оценка распространенности уровня устойчивости к фторхинолонам клинических изолятов *C.trachomatis*, выделенных в гинекологической практике г. Караганды, на основе анализа мутаций QRDR региона генов топоизомераз. Результаты данного исследования указывают на низкий процент устойчивых штаммов в Карагандинском регионе, что позволяет выбрать ФХ в качестве априорной терапии при хламидийной инфекции.

Впервые проведен сложный *in silico* анализ геномных последовательностей глобальной коллекции на выявление мутаций в генах-мишенях для фторхинолонов, с использованием комплекса биоинформатических программ. Результаты анализа глобальной коллекции хламидий указывают на крайне низкую устойчивость *C.trachomatis* к ФХ. Результаты, полученные на клинических штаммах *C.trachomatis* и анализе геномных данных международной коллекции *C.trachomatis*, согласуются, указывая на низкий уровень резистентности хламидий к фторхинолонам на текущем этапе.

Практическая значимость

- Низкое распространение устойчивости *C.trachomatis* к фторхинолонам, изученное на основе генетических механизмов резистентности, позволяет использовать фторхинолоны в качестве эмпирической антибактериальной химиотерапии на современном этапе.

- Рекомендовать разработанную в НИИАХ (г. Смоленск) методику определения мутантных штаммов по QRDR региону генов-топоизомераз на основе ПЦР с последующим анализом температурных кривых плавления (HRM анализ) в диагностической практике, с целью детекции генетических механизмов устойчивости хламидий к фторхинолонам и подтверждения устойчивости в случаях «клинически» неуспешного лечения.

- Продолжить и расширить исследование по изучению «классических» генетических механизмов устойчивости хламидий к фторхинолонам, с целью уточнения эпидемиологической оценки распространенности резистентности на территории Республики Казахстан.

Внедрение результатов в практику

Результаты исследований, полученные в ходе подготовки данной диссертационной работы, а также на основе анализа литературных данных, национальных программ по ИППП и рекомендаций ВОЗ, внедряются в клиническую практику и работу кафедры акушерства и гинекологии. На данный момент уже внедрен принцип лабораторного теста на детекцию устойчивости хламидий к фторхинолонам, а также разработана форма анкеты для сбора информации о сексуальном поведении людей, с целью оценки риска инфицирования ИППП (Приложения А и Б).

Основные положения диссертации, выносимые на защиту

1. Доля хламидийной инфекции в современной гинекологической практике г. Караганда, оцененная на основе ПЦР диагностики, составила 11% (95% ДИ: 8,57-14,02).

2. Отсутствие клинической симптоматики при половых инфекциях, а также ранее начало половой жизни - являются факторами риска заражения ИППП.

3. Низкий уровень распространенности резистентности к фторхинолонам у хламидий, оцененный на определении мутационного профиля в генах-мишенях топоизомераз, позволяет использовать препараты данной группы в качестве эмпирической антибактериальной терапии на современном этапе.

4. In silico исследование с использованием биоинформатического и статистического подходов на основе полногеномных последовательностей патогенов из группы ИППП, включая *C.trachomatis*, - является важным информативным инструментом, который позволяет получить данные не только о наличии/отсутствии мутаций, ассоциированных с устойчивостью, но и о генах резистентности, а также данные о факторах патогенности и внутривидовой кластеризации.

Связь диссертации с другими научно-исследовательскими работами

Диссертационная работа выполнялась в рамках международного сотрудничества между Карагандинским государственным медицинским университетом (Караганда, Казахстан) и НИИ антимикробной химиотерапии ГБОУ ВПО СГМА Минздрава России (Смоленск, Россия).

Апробация диссертации

Основные положения и результаты работы докладывались на:

26 Европейском конгрессе клинической микробиологии и инфекционных заболеваний – ECCMID, Амстердам (Нидерланды), 9-12 апреля 2016 года;

XVIII Международном конгрессе МАКМАХ по антимикробной терапии, Москва (Россия), 25-27 мая 2016 г.

Международной конференции молодых ученых «Мир науки и молодежь: новые пути развития», Караганда (Казахстан), 12 апреля 2016 г.

На 25 Европейском конгрессе Акушерства и Гинекологии совместно с 15 конгрессом Турецкого сообщества Гинекологов и Акушеров – EBCOG, Анталия (Турция), 17-21 мая 2017 г.

XIX Международном конгрессе МАКМАХ/ESCMID по антимикробной терапии, Москва (Россия), 17-19 мая 2017 г.

Международной конференции молодых ученых «Мир науки и молодежь: новые пути развития», Караганда (Казахстан), 12 апреля 2017 г.

Имеется свидетельство о государственной регистрации прав на объект авторского права. № 588 от 24.04.2014г.

Предзащита проходила на заседании научно-экспертной комиссии КГМУ, протокол № 9 от 29 июня 2017 г.

Публикации

По материалам диссертации опубликовано 11 работ. В изданиях, рекомендованных Комитетом по контролю в сфере образования и науки, опубликовано 7 работ. В изданиях, входящих в базу данных Scopus, опубликована 1 статья.

Структура и объем диссертации

Диссертация изложена на 99 страницах, состоит из введения, основной части, заключения и списка использованных источников, включающих 259 ссылок на источники. В работе содержится 11 таблиц, 18 рисунков и 3 приложения.

Материалы и методы

Первичным этапом текущей исследовательской работы были прием, учет и анкетирование пациентов, обратившихся в Городскую больницу №1. После осмотра на наличие клинически выраженных симптомов воспаления, результаты которого вносились в анкету и журнал учета пациенток, выполнялась процедура забора клинического материала в виде урогенитального соскоба. В последующем материал направлялся в клинко-диагностическую лабораторию, на диагностику широкого спектра возбудителей ИППП, включая хламидия, уреаплазма, микопlasма, гарднерелла, трихомонада, кандида, цитомегаловирус и вирус простого герпеса 1/2 типов, на основе ПЦР исследования.

По результатам лабораторного исследования, а также соответствия критериям включения/исключения, образцы ДНК с положительными результатами ПЦР на ДНК *S.trachomatis* были отправлены в НИИ антимикробной химиотерапии ГБОУ ВПО СГМА Минздрава России (Смоленск, Россия). Совместно с группой исследователей, во главе с Инной Александровной Эйдельштейн, провели ПЦР анализ на наличие мутаций в генах ДНК-гиразы и топоизомеразы IV в области QRDR, методом плавления высокого разрешения.

На следующем этапе было решено провести биоинформатический анализ полногеномных данных *C.trachomatis* на наличие однонуклеотидных замен в области связи фторхинолонов с участками генов-мишеней. В результате качественной сборки ДНК последовательностей в более продолжительные контиги и скаффолды было полученой 903 полногеномной последовательности, в которых методом виртуальной ПЦР проводилась детекция внутренних фрагментов *gugA* и *parC* генов. Метод множественного выравнивания позволил обнаружить SNP в искомым генах и определить тип мутаций.

В завершающей стадии была проведена оценка излеченности как ПЦР диагностикой на *C.trachomatis*, так и методом осмотра пациенток на наличие признаков воспаления.

Выводы:

1. Структура ИППП, полученная на основе ПЦР диагностики, представлена в следующем виде: *U.parvum* (34,5% (95% ДИ: 30,54-38,68)), *Candida albicans* 28,5% (95% ДИ: 24,73-32,46). Вирус простого герпеса I/II типа 24,2% (95% ДИ: 20,73-28,09). *G.vaginalis* 21,5% (95% ДИ: 18,1-25,2). *U.urealyticum* 20,4% (95% ДИ: 17,1-24). CMV 19,5% (95% ДИ: 16,3-23,1). *M.hominis* 15,9 % (95% ДИ: 12,88-19,18). *M.genitalium* 8,8% (95% ДИ: 6,63-11,59). *T.vaginalis* 2,75% (95% ДИ: 1,61-4,6). На долю *Chlamydia trachomatis* пришлось порядка 11% (95% ДИ: 8,57-14,02).

2. Во всех случаях не было детектировано статистически значимого различия между наличием симптоматических признаков и этиологическим агентом ИППП ($p > 0,05$), за исключением случая с *M.hominis* ($p = 0,0237$). Данный факт показывает, что отсутствие симптоматики встречается в равной степени, как и наличие клинических симптомов, что, в свою очередь, представляет собой фактор, повышающий риск приобретения ИППП.

3. Ранний половой дебют является статистически значимым фактором, повышающим риск приобретения ИППП. Было получено, что более раннее начало половой жизни на каждые 1-4 года повышает риск заражения в 1,16 раз ($p = 0,0480$).

4. Анализ мутаций в QRDR регионе *gugA* и *parC* генов, ассоциированных с устойчивостью к фторхинолонам, коллекции клинических изолятов *C.trachomatis* ($n = 55$) показал, что резистентность хламидий к ФХ наблюдается в 0% (95% ДИ: 0-6,5%).

5. *In silico* исследование на полногеномных последовательностях международной коллекции *Chlamydia trachomatis* ($n = 913$) выявил устойчивость хламидий к ФХ на уровне 0,1% (95% ДИ: 0,002-0,6%).

Список литературы:

- 1 Sziller I., Witkin S.S., Ziegert M. et al. Serological responses of patients with ectopic pregnancy to epitopes of the Chlamydia trachomatis 60 kDa heat shock protein // Hum Reprod. - 1998. - Vol. 13, № 4. - P. 1088-1093.
- 2 Cohen C.R., Brunham R.C. Pathogenesis of Chlamydia induced pelvic inflammatory disease // Sex Transm Infect. - 1999. - Vol. 75, № 1. - P. 21-24.
- 3 Paavonen J., Eggert-Kruse W. Chlamydia trachomatis: impact on human reproduction // Hum Reprod Update. - 1999. - Vol. 5, № 5. - P. 433-447.
- 4 Ridgway G.L. Treatment of chlamydial genital infection // J. Antimicrob Chemother. - 1997. - Vol. 40, № 3. - P. 311-314.
- 5 Somani J., Bhullar V.B., Workowski K.A. et al. Multiple drug-resistant Chlamydia trachomatis associated with clinical treatment failure // J. Infect. Dis. - 2000. - Vol. 181, № 4. - P. 1421-1427.
- 6 Yokoi S., Yasuda M., Ito S. et al. Uncommon occurrence of fluoroquinolone resistance-associated alterations in GyrA and ParC in clinical strains of Chlamydia trachomatis // J. Infect. Chemother. - 2004. - Vol. 10, № 5. - P. 262-267.
- 7 Misiurina O., Shipitsina E.V., Finashutina Iu P. et al. Analysis of point mutations in the ygeD, gyrA and parC genes in fluoroquinolones resistant clinical isolates of Chlamydia trachomatis // Mol. Gen. Mikrobiol. Virusol. - 2004. - Vol. 3. - P. 3-7.

Исполнитель

Амирбекова Ж.Т.