

Полногеномное секвенирование штаммов *Mycoplasma hominis*, устойчивых к ципрофлоксацину

Колесникова Е.А., Бруснигина Н.Ф., Махова М.А., Алексеева А.Е.

ФБУН «Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. акад. И.Н. Блохиной» Роспотребнадзора, Нижний Новгород, Россия

Контактный адрес:

Елена Александровна Колесникова
Эл. почта: shmelevael@yandex.ru

Ключевые слова: *Mycoplasma hominis*, полногеномное секвенирование, резистентность, ципрофлоксацин, *gyrA*, мутации.

С целью определения молекулярного механизма резистентности к ципрофлоксацину были исследованы клинические изоляты *Mycoplasma hominis* (2 штамма), выделенные у женщин с воспалительными заболеваниями органов малого таза. Проведено полногеномное секвенирование на высокопроизводительном секвенаторе MiSeq (Illumina, США). Показано, что штаммы *M. hominis* M57 и *M. hominis* M45 обладают характерным для данного вида содержанием ГЦ-оснований – 27,2%. Установлена высокая степень гомологии белковых последовательностей штаммов *M. hominis* M57 и *M. hominis* M45. Филогенетический анализ показал, что штамм *M. hominis* M57 эволюционно ближе расположен к штамму *M. hominis* PG21, а *M. hominis* M45 к *M. hominis* H34. Анализ аминокислотных последовательностей генов *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE* изолятов *M. hominis* M45 и *M. hominis* M57 выявил, что молекулярный механизм их резистентности к ципрофлоксацину обусловлен наличием мутационного изменения в QRDR области гена *gyrA* (субъединица А ДНК-гиразы) с заменой серина (Ser) на лейцин (Leu) в позиции 83. Мутаций, затрагивающих кодоны аминокислот в QRDR области генов *gyrB*, *parC* и *parE*, не обнаружено. Анализ структуры генов *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE* показал высокую степень полиморфизма, обусловленную высокой частотой спонтанных мутаций. Определено, что в геноме штаммов *M. hominis* M45 и *M. hominis* M57 присутствуют гены семейства эффлюксной системы MATE, но на сегодняшний день их роль в развитии резистентности *M. hominis* экспериментально не доказана.

Whole genome sequencing of *Mycoplasma hominis* strains resistant to ciprofloxacin

Kolesnikova E.A., Brusnigina N.F., Makhova M.A., Alekseeva A.E.

Nizhny Novgorod Research Institute of Epidemiology and Microbiology named after I.N. Blokhina, Nizhny Novgorod, Russia

Contacts:

Elena A. Kolesnikova
E-mail: shmelevael@yandex.ru

Key words: *Mycoplasma hominis*, whole genome sequencing, resistance, ciprofloxacin, *gyrA*, mutation.

In order to determine molecular mechanisms of resistance to ciprofloxacin, clinical isolates of *Mycoplasma hominis* (2 strains) obtained from women with pelvic inflammatory disease were investigated. Whole genome sequencing was performed using a high-performance MiSeq sequencer (Illumina, USA). *M. hominis* M57 and M45 isolates were found to have the proportion of GC-bases which is typical for this species (27.2%). A high degree of the protein sequences homology of the M57 and M45 isolates has been determined. Phylogenetic analysis showed that the M57 isolate is evolutionarily closer to the PG21 isolate, and M45 is evolutionarily closer to H34. Analysis of the amino acid sequences of *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* genes in M45 and M57 isolates detected that the molecular mechanism of ciprofloxacin resistance is due to the presence of mutational changes in the QRDR of *gyrA* gene (DNA gyrase subunit A) leading to substitution of serine for leucine at the position 83. No mutations affecting the codons in the QRDR of *gyrB*, *parC* and *parE* genes were detected. Analysis of the *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* genes structure showed a high degree of polymorphism due to the high spontaneous mutations rate. The genomes of *M. hominis* M45 and M57 isolates found to carry genes of the MATE family efflux pumps, but their role in the development of antimicrobial resistance in *M. hominis* has not been proved experimentally to date.

Введение

Проблема резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам является общепризнанной и рассматривается как социальная проблема и реальная угроза здоровью людей. Зачастую клиницисты при назначении антибактериальной терапии не обладают достаточной информацией об этиологическом агенте, спектре и степени его резистентности, что приводит к выбору неэффективных препаратов, усиливает селективное давление антибиотиков на популяцию микроор-

ганизмов, способствует возникновению и распространению полирезистентных штаммов среди населения [1-4].

Актуальность проблемы подтверждается данными литературы о снижении чувствительности генитальных микоплазм к фторхинолонам (ФХ), широко используемым при лечении воспалительных заболеваний органов малого таза (ВЗОМТ) [5-7]. Информация о спектре и степени резистентности возбудителей различных воспалительных заболеваний, в частности, заболеваний уро-

генитального тракта, должна служить основой для назначения эффективных антибактериальных препаратов, что позволит избежать серьезных осложнений [1, 7].

В последнее время молекулярные методы активно применяются для выявления генетических детерминант резистентности у различных микроорганизмов, в том числе *Mycoplasma hominis* [5, 8-10]. Мутации в генах, приводящие к модификации мишени связывания с антибиотиком, описаны для различных групп препаратов. Основой формирования резистентности к ФХ у грамотрицательных бактерий, в том числе и у *M. hominis*, являются аминокислотные замены в QRDR (Quinolone Resistance-Determining Region) участках субъединиц ДНК-гиразы (*gyrA*, участок между аминокислотными остатками 67 и 106, обычно в позициях 83, 84 и 87) и топоизомеразы IV (*parC*, позиции 80, 84, 91) [11-14].

Целью данной работы являлось изучение молекулярно-генетических особенностей клинических изолятов *M. hominis* M45 и *M. hominis* M57 и определение механизма их устойчивости к ципрофлоксацину.

Материалы и методы

В работе исследовали ДНК двух изолятов *M. hominis*, выделенных из соскобов эпителия цервикального канала у женщин с ВЗОМТ, являющихся пациентками одного из ЛПУ Нижнего Новгорода. Фенотипически изучаемые штаммы микоплазм характеризовались устойчивостью к ципрофлоксацину. Секвенирование штаммов *M. hominis* M45 и *M. hominis* M57 проводили с использованием высокопроизводительного секвенатора MiSeq (Illumina, США). Выделение и очистку ДНК проводили с использованием набора «АмплиПрайм ДНК-сорб-В» (ЦНИИЭ Роспотребнадзора, Россия). Концентрацию ДНК в образцах определяли с помощью флуориметра Qubit (Invitrogen, Австрия). При подготовке библиотеки ДНК для секвенирования использовали набор Nextera XT Sample Preparation kit (Illumina, США), секвенирование проводили с использованием набора MiSeq reagent kit v2 (Illumina, США) на 500 циклов. Для выравнивания нуклеотидных последовательностей использовали программу Burrows-Wheeler Aligner (BWA). Визуализацию и анализ полученных данных проводили с помощью программного обеспечения UGENE Unipro и MEGA5. Аннотацию генома проводили с использованием сервера RAST (Rapid Annotation using Subsystem Technology, <http://rast.nmpdr.org/rast.cgi>) и NCBI Prokaryotic Genome Annotation Pipeline (PGAP) (www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/annotation_prok/). Построение филогенетических деревьев осуществляли с использованием методов UPGMA и Neighbor Joining. В качестве эталона служила полногеномная последовательность штамма *M. hominis* ATCC 23114 (номер GenBank FP236530.1).

Результаты и обсуждение

Основные результаты полногеномного секвенирования и аннотирования генома микоплазм представлены в Таблице 1. Данные, представленные в Таблице 1, по-

Таблица 1. Общие результаты полногеномного секвенирования штаммов *M. hominis* M45 и M57

Характеристика	Штаммы <i>Mycoplasma hominis</i>	
	<i>M. hominis</i> M45	<i>M. hominis</i> M57
Количество прочтений, млн.	3,8	2,6
Общее число контигов	36	38
Размер генома, п.н.	643 100	636 500
ГЦ, %	27,1	27,2
Количество белок-кодирующих последовательностей	546	543
Количество уникальных белок-кодирующих последовательностей	14	4
Количество рРНК	6	6
Количество тРНК	33	37
Количество генов	591	585
Количество псевдогенов	32	32
Количество белков	517	511

казывают, что оба штамма имеют сходные значения в структуре генома. Содержание GC-оснований у штамма *M. hominis* M45 составило 27,1%, у *M. hominis* M57 – 27,2%, что соответствует данным о других представителях вида *M. hominis*, имеющихся в базе NCBI Genome. Общее число генов у изолята *M. hominis* M45 составило 591, псевдогенов – 32; у *M. hominis* M57 общее количество генов – 585, псевдогенов – 32. Результаты аннотирования геномов с использованием сервера RAST показали высокую степень гомологии белковых последовательностей исследуемых клинических изолятов, составившую 95%.

Филогенетический анализ 13 штаммов микоплазм, чьи геномы аннотированы в международную базу данных GeneBank/NCBI, показал эволюционно высокую степень родства всех штаммов микоплазм (Рисунок 1). Следует отметить, что изолят *M. hominis* M45 филогенетически ближе к штамму *M. hominis* H34, который был выделен в России (Гущин А. и соавт., 2017), а *M. hominis* M57 к *M. hominis* ATCC 23114 (Pereyre S. и соавт., 2009) и *M. hominis* TOA (Гущин А. и соавт., 2017).

С целью определения молекулярного механизма резистентности к ФХ проведен анализ QRDR области генов-мишеней *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE*. Основные результаты сравнения структуры генов и кодирующих белков штаммов *M. hominis* M45 и *M. hominis* M57, проведенных относительно референтного штамма *M. hominis* ATCC 23114 (номер GenBank FP236530.1), представлены в Таблице 2 и Таблице 3.

Данные свидетельствуют о высокой степени полиморфизма генов *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE*, как у *M. hominis* M45, так и у *M. hominis* M57, обусловленного большим количеством спонтанных мутаций, не затрагивающих кодоны аминокислот. Так, в гене *gyrA* выявлены аминокислотные замены в четырех позициях, в гене *gyrB* – в двух позициях, в гене *parC* – в восьми позициях, в гене *parE* – в двух позициях. Размер генов, кодирующих резистентность к ФХ у исследуемых штаммов, был одинаковый. Отличия выявлены в общем количестве мутаций,

Таблица 2. Характеристика генетических детерминант резистентности к фторхинолонам у штамма *M. hominis* M45 относительно референтного штамма *M. hominis* ATCC 23114

Наименование гена	Длина нуклеотидной последовательности	Длина аминокислотной последовательности	Количество мутаций	Количество замен	Позиция и замены аминокислот
<i>gyrA</i>	2736	911	48	4	65 аргинин (R) – лизин (K) 525 лизин (K) – аргинин (R) 871 аспарагин (N) – серин (S) 903 глутаминовая кислота (E) – лизин (K)
<i>gyrB</i>	1947	648	29	2	143 лизин (K) – аргинин (R) 313 треонин (T) – изолейцин (I)
<i>parC</i>	2802	933	44	8	542 серин (S) – аспарагин (N) 632 валин (V) – изолейцин (I) 649 метионин (M) – изолейцин (I) 666 аспарагин (N) – серин (S) 743 серин (S) – лейцин (L) 827 валин (V) – аланин (A) 828 аспарагиновая кислота (D) – аспарагин (N) 862 глутамин (Q) – глутаминовая кислота (E)
<i>parE</i>	1920	639	14	2	387 лизин (K) – аргинин (R) 546 лейцин (L) – фенилаланин (F)

Таблица 3. Характеристика генетических детерминант резистентности к фторхинолонам у штамма *M. hominis* M57 относительно референтного штамма *M. hominis* ATCC 23114

Наименование гена	Длина нуклеотидной последовательности	Длина аминокислотной последовательности	Количество мутаций	Количество замен	Позиция и замены аминокислот
<i>gyrA</i>	2736	911	37	4	65 аргинин (R) – лизин (K) 443 аргинин (R) – серин (S) 745 аспарагиновая кислота (D) – аспарагин (N) 903 изолейцин (I) – лизин (K)
<i>gyrB</i>	1947	648	16	2	168 валин (V) – аланин (A) 313 треонин (T) – изолейцин (I)
<i>parC</i>	2802	933	34	8	144 лизин (K) – аргинин (R) 616 аспарагин (N) – серин (S) 623 метионин (M) – изолейцин (I) 633 валин (V) – изолейцин (I) 743 серин (S) – лейцин (L) 827 валин (V) – аланин (A) 898 аспарагиновая кислота (D) – аспарагин (N) 908 валин (V) – изолейцин (I)
<i>parE</i>	1920	639	16	1	387 лизин (K) – аргинин (R)

а также в аминокислотных заменах. По данным литературы, одной из причин генетического полиморфизма *M. hominis* является отсутствие корректирующей 3'→5' экзонуклеазной активности у ДНК-полимеразы III [5, 12].

В структуре QRDR области гена *gyrA*, как у *M. hominis* M45, так и у *M. hominis* M57 обнаружена мутация, приводящая к аминокислотной замене в позиции 83 (замена серина (Ser) на лейцин (Leu)) (Рисунок 2). Примеры наиболее часто встречающихся аминокислотных замен в генах-мишенях (*gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE*) *M. hominis*, ответственных за снижение чувствительности к ФХ, представлены в Таблице 4. Аминокислотная замена Ser83→Leu обуславливает возникновение резистентности к ципрофлоксацину у исследуемых штаммов микоплазм. Мутаций с заменами в аминокислотных последовательностях QRDR области генов *gyrB*, *parC*, *parE* обнаружено не было.

Таблица 4. Аминокислотные замены в QRDR области генов-мишеней, ассоциированные с возникновением резистентности к фторхинолонам [10–14]

Мутации в генах <i>M. hominis</i>		
<i>gyrA</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>
Ser83→Leu	Ser91→Ile	Asp426→Asn
Ser83→Trp	Ser91→Tyr	Arg447→Lys
Ser84→Trp	Arg80→Tyr	Asp456→Asn
Ser84→Pro	Arg84→His	
Glu87→Lys	Ser92→Pro	
Glu87→Ala	Glu95→Lys	
	Lys134→Arg	

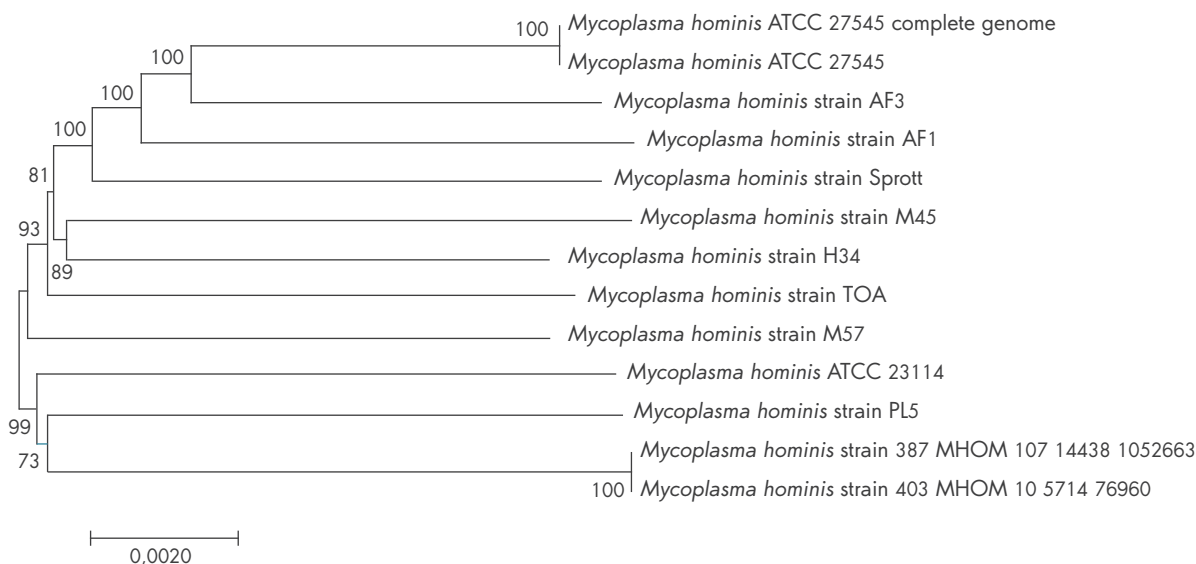


Рисунок 1. Филогенетическое дерево, построенное методом Neighbor Joining по аннотированным в GeneBank/NCBI геномным последовательностям 13 штаммов *M. hominis*.

Примечание: цифры в узлах дерева обозначают уровень поддержки, полученный с помощью метода Rapid Bootstrap

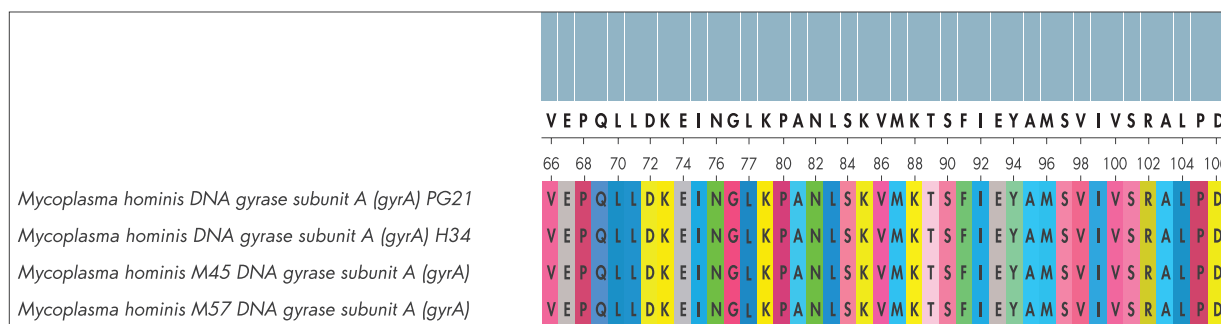


Рисунок 2. Выравнивание аминокислотной последовательности QRDR области гена *gyrA* штаммов *M. hominis* PG21, H34, M57, M45 с помощью программного обеспечения BLAST и UGENE Unipro

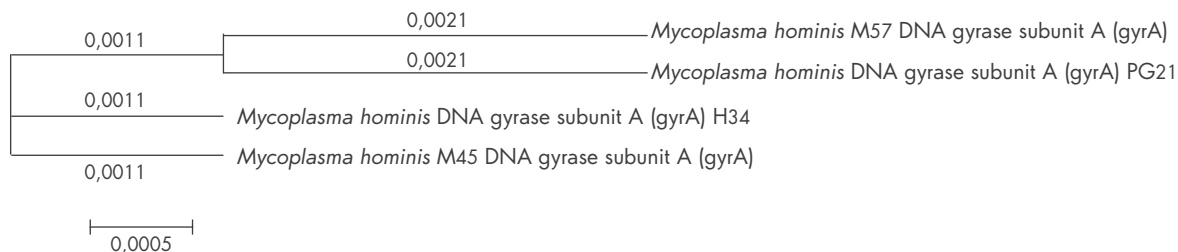


Рисунок 3. Филогенетическое дерево, построенное с помощью программного обеспечения UGENE Unipro и MEGA5 по аннотированным в GeneBank/NCBI последовательностям генов штаммов *M. hominis* PG21, H34, M57, M45

Результаты филогенетического анализа гена *gyrA* свидетельствуют о высоком уровне гомологии гена *gyrA* между штаммами *M. hominis* M57 – *M. hominis* PG21, а также между штаммами *M. hominis* M45 – *M. hominis* H34, что коррелирует с данными филогенетического анализа полногеномных последовательностей изученных штаммов микоплазм (Рисунок 3).

В геноме *M. hominis* M57 и *M. hominis* M45 обнаружены гены, относящиеся к семейству MATE эффлюксной системы. Биоинформационный анализ этих генов показал, что длина их нуклеотидной (1809 нуклеотидов) и аминокислотной последовательностей (602 аминокислоты) не отличалась у исследуемых штаммов. На сегодняшний день роль эффлюкса в развитии резистентности микоплазм к антибактериальным препаратам при помощи генов семейства MATE экспериментально не доказана.

Заключение

Впервые в Нижнем Новгороде проведено полногеномное секвенирование клинических изолятов *M. hominis*, выделенных у женщин с ВЗОМТ. Определен молекулярный механизм резистентности к ципрофлокса-

цину, обусловленный заменой серина (S) на лейцин (L) в 83 позиции QRDR области гена *gyrA*. Следует отметить высокий уровень полиморфизма генов *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE*, достигающийся за счёт большого количества нуклеотидных замен. Клинические изоляты *M. hominis* M57 и *M. hominis* M45 обладают характерным для данного вида содержанием GC-оснований – 27,2%. Показана высокая степень гомологии их белковых последовательностей. В геноме исследуемых штаммов обнаружены гены семейства MATE, но их роль в развитии антимикробной резистентности *M. hominis* на сегодняшний день экспериментально не доказана. Филогенетический анализ генома микоплазм показал, что штамм *M. hominis* M57 эволюционно ближе расположен к *M. hominis* PG21, а *M. hominis* M45 – к *M. hominis* H34. Подобные исследования позволяют определять природу и механизмы формирования резистентности к различным группам антибактериальных препаратов.

Финансирование. Исследование не имело спонсорской поддержки.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Литература

1. Gerasimova N.M., Evstigneeva N.P., Kuznetsova Yu.N. Urogenital infections as an interdisciplinary problem. Modern approaches to diagnosis and treatment. Vestnik poslediplomnogo meditsinskogo obrazovaniya. 2009;(1):17-19. Russian. (Герасимова Н.М., Евстигнеева Н.П., Кузнецова Ю.Н. Урогенитальные инфекции как междисциплинарная проблема. Современные подходы к диагностике и лечению. Вестник последипломного медицинского образования. 2009;(1):17-19.).
2. Savicheva A.M. Modern ideas about genital mycoplasmas. Mat' i ditja. 2010;18(4):183-186. Russian. (Савичева А.М. Современные представления о генитальных микоплазмах. Мать и дитя. 2010;18(4):183-186.).
3. Fofanova I.Yu. Edited by Prilepskaya V.N. Sexually Transmitted Infections. Moscow: GEOTAR-Media, 2014. 157 p. Russian. (Фофанова И.Ю. Под ред. Прилепской В.Н. Инфекции, передающиеся половым путем. Москва: ГЭОТАР-Медиа, 2014. 157 с.).
4. Rakhmatullina M.R., Kirichenko S.V. Current concepts of genetic variability of genital mycoplasmas and their role in the development of inflammatory diseases of the urogenital system. Vestnik dermatologii i venerologii. 2013;(3):17-25. Russian. (Рахматулина М.Р., Кириченко С.В. Современные представления о генетической вариабельности генитальных микоплазм и их роли в развитии воспалительных заболеваний мочеполовой системы. Вестник дерматологии и венерологии. 2013;(3):17-25.).
5. Chernova O.A., Medvedeva E.S., Muzykantov A.A., Baranova N.B., Chernov V.M. Mycoplasma and their resistance to antibiotics: problems and prospects for controlling mycoplasma infections and contamination of cell cultures. ACTA NATURE. 2016;8 (2Pt29):27-38. Russian. (Чернова О.А., Медведева Е.С., Музыкантов А.А., Баранова Н.Б., Чернов В.М. Микоплазмы и их устойчивость к антибиотикам: проблемы и перспективы контроля микоплазменных инфекций и контаминаций клеточных культур. ACTA NATURE. 2016;8(2Pt29):27-38.).
6. Taylor-Robinson D. Infections due to species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma*: an update. Clin Infect Dis. 2014;18:671-684.
7. Savicheva A.M., Shipitsyna E.V., Bashmakova M.A. Genital mycoplasmas – problems of diagnosis and treatment. Clinicheskaja dermatologija i venerologija. 2008;(6):80-90. Russian. (Савичева А.М., Шипицына Е.В., Башмакова М.А. Генитальные микоплазмы – проблемы диагностики и лечения. Клиническая дерматология и венерология. 2008;(6):80-90.).
8. 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(8):1647-1650.
9. Yoshida H., Bogaki M., Nakamura M., Yamanaka L.M., Nakamura S. Quinolone resistance-determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli*. Antimicrob Agents Chemother. 1990;34(6):1271-1272.
10. Bebear C.M., Renaudin J., Charron A., et al. Mutations in the *gyrA*, *parC*, and *parE* genes associated with fluoroquinolone resistance in clinical isolates of *Mycoplasma hominis*. Antimicrob Agents Chemother. 1999;43(4):954-956.
11. Gushchin A.E. The role of point mutations in the topoisomerase IV and DNA gyrase genes in developing fluoroquinolone resistance in *Mycoplasma hominis*. PhD thesis. Moscow, 1999. 102 p. Russian. (Гущин А.Е. Роль точечных мутаций в генах топоизомеразы IV и ДНК гиразы в формировании резистентности *Mycoplasma hominis* к фторхинолонам. Дисс. канд. биол. наук. Москва, 1999. 102 с.).
12. Govorun V.M. Molecular mechanisms of resistance to tetracyclines and fluoroquinolones in mollikut. PhD thesis. Moscow, 2000. 59 p. Russian. (Говорун В.М. Молекулярные механизмы формирования резистентности к тетрациклинам и фторхинолонам у молликут. Автореф. дисс. докт. биол. наук. Москва, 2000. 59 с.).
13. Bebear C.M., Bove J.M., Bebear C., Renaudin J. Characterization of *Mycoplasma hominis* mutations involved in resistance to fluoroquinolones. Antimicrob Agents Chemother. 1997;41(2):269-273.
14. Meng D.Y., Sun C.J., Yu J.B., et al. Molecular mechanism of fluoroquinolones resistance in *Mycoplasma hominis* clinical isolates. Braz J Microbiol. 2014;45(1):239-242.