

С.А. Костюк, Т.В. Руденкова, Н.А. Бадыгина, О.С. Полуян

ВЫЯВЛЕНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МАРКЕРОВ УСТОЙЧИВОСТИ К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ В КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТАХ MYCOPLASMA GENITALIUM

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»

Применение антибактериальных препаратов в терапии различных воспалительных заболеваний привело к росту числа антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов. Проведено исследование по выявлению генетических маркеров устойчивости *Mycoplasma genitalium* к группам антибактериальных препаратов (тетрациклины, макролиды, фторхинолоны), применяемым при лечении инфекций уrogenитального тракта, обусловленных присутствием данного возбудителя. В клинических изолятах *Mycoplasma genitalium* было проведено выявление tet-детерминант, а также изучение нуклеотидных последовательностей генов 23S рРНК, *gyrA* и *parC*. Полученные результаты позволили подтвердить широкую распространенность штаммов *Mycoplasma genitalium* устойчивых к антибактериальным препаратам группы тетрациклинов (52,94%), а также установить распространенность штаммов возбудителя устойчивых к препаратам групп макролидов (26,47%) и фторхинолонов (5,88%).

Ключевые слова: *Mycoplasma genitalium*, генетические маркеры, антибактериальные препараты, устойчивость-чувствительность.

S.A. Kostiuk, T.V. Rudenkova, N.A. Badigina, O.S. Poluyan

DETECTING OF GENETIC MARKERS OF RESISTANCE TO ANTIBACTERIAL MEDICINES IN MYCOPLASMA GENITALIUM CLINICAL ISOLATES

Antibacterial medicines application in various inflammatory diseases therapy has led to antibiotic-resistant microorganisms isolates number growth. Research for genetic markers of *Mycoplasma genitalium* resistance to groups of antibacterial medicines (tetracycline, macroleads, fluoroquinolones), applied for treatment of urogenital tract infections, caused by presence of this causative agent, was performed. Tet-determinantes revealing, nucleotide sequences of 23S rRNA, *gyrA* and *parC* genes analysis has been carried out in *Mycoplasma genitalium* clinical isolates. The received results have allowed to confirm wide prevalence of *Mycoplasma genitalium* isolates resistant to tetracycline group antibacterial medicines (52,94 %) and to define prevalence of infectious agent isolates which was resistant to macroleads (26,47%) and fluoroquinolones (5,88%).

Key words: *Mycoplasma genitalium*, genetic markers, antibacterial medicines, resistance-sensitivity.

В клинических изолятах *Mycoplasma genitalium* проведено выявление генетических маркеров устойчивости к группам антибактериальных препаратов (тетрациклины, макролиды, фторхинолоны), применяемым при лечении инфекций уrogenитального тракта, обусловленных присутствием данного возбудителя. Анализ присутствия tet-детерминант, обуславливающих формирование устойчивости к препаратам группы тетрациклинов, был проведен с применением метода классической ПЦР. Распространенность штаммов *Mycoplasma genitalium* устойчивых к антибактериальным препаратам группы тетрациклинов была выявлена на уровне 52,94%. Для выявления генетических маркеров устойчивости *Mycoplasma genitalium* к препаратам групп макролидов и фторхинолонов было проведено изучение нуклеотидных последовательностей генов 23S рРНК, *gyrA* и *parC*, с применением секвенирующей ПЦР. Полученные результаты позволили установить распространенность штаммов возбудителя устойчивых к препаратам групп макролидов (26,47%) и фторхинолонов (5,88%).

Впервые возбудитель *Mycoplasma genitalium* (*M. genitalium*) был описан в 1981 году, когда данный микроорганизм был выделен от двух из 13 мужчин с негонококковым уретритом [14]. *M. genitalium* вызывает воспалительные процессы уrogenитального тракта у мужчин (негонококковый уретрит) и женщин (аднексит, цервицит, кольпит), выступает в роли самостоятельного фактора влияющего на развитие осложнений течения беременности (угроза прерывания беременности, фетоплацентарная недостаточность, анемия, гестоз, преждевременное старение плаценты), а также может являться причиной перинатального инфицирования ново-

рожденных [1, 3].

Для лечения инфекций уrogenитального тракта, обусловленных *M. genitalium* в настоящее время применяют три группы антибактериальных препаратов: тетрациклины, макролиды, фторхинолоны [4, 10]. Недостаточность и неэффективность терапевтических мероприятий при лечении *M. genitalium*-индуцированных инфекций приводят к неполной элиминации возбудителя из организма, что сопровождается переходом инфекционного процесса в латентный. Необходимо учитывать, что успешное лечение зависит от адекватного назначения антибиотикотерапии с учетом лабораторных исследований, включающих определение чувствительности-устойчивости возбудителя к антибактериальным препаратам [5].

M. genitalium является трудно культивируемым микроорганизмом, поэтому на сегодняшний день использование культурального метода для выявления *M. genitalium* и определения чувствительности-устойчивости возбудителя к антибактериальным препаратам является очень трудоемким и длительным и может занимать от нескольких недель до нескольких месяцев. Поэтому для этих целей используют методы молекулярно-биологического анализа (метод полимеразной цепной реакции – ПЦР) [12, 10].

Применение антибактериальных препаратов в терапии различных воспалительных заболеваний привело к росту числа антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов, что делает актуальным изучение феномена антибиотикорезистентности, а также разработку методов определения устойчивости к антибактериальным препаратам у возбудителей [2, 11].

Шесть классов tet-генов обеспечивают появление устойчивости возбудителей к антибактериальным препаратам ряда тетрациклинов через механизм защиты рибосом – это tetM, tetO, tetB P, tet Q, tetS и otrA. Присутствие tet-генов в клетках возбудителя обеспечивает защиту бактериальной клетки от воздействия препаратов ряда тетрациклина путем изменения конформации рибосомы так, что сродство антибиотика к местам узнавания резко снижается.

Включение в геном *M. genitalium* стрептококковой детерминанты устойчивости к тетрациклину (например tet-M) является результатом переноса генов между филогенетически неродственными микроорганизмами, т.е. может служить примером миграции генов между различными неродственными генетическими системами. Наличие tet-детерминант является маркером резистентности возбудителя к антибактериальным препаратам ряда тетрациклинов и может служить основой для выбора рационального подхода к антибактериальной терапии [9, 12].

Во многих исследованиях было показано, что макролиды обладают высокой антимикробной активностью по отношению к *M. genitalium*, тогда как активность тетрациклинов и фторхинолонов ниже [13]. Однако, в 5 - 28% случаев, при лечении инфекций, обусловленных *M. genitalium* с использованием антибактериальных препаратов группы макролидов, у пациентов не удается достичь полной элиминации возбудителя. Наибольший процент неудач (28%) связан с предшествующим назначением пациенту лечения инфекционного процесса однократным приемом азитромицина в дозе 1г [6, 7].

Устойчивость к антибактериальным препаратам из группы макролидов у *M. genitalium* связана с нуклеотидными заменами в V домене гена 23S рРНК в позициях A2058, A2059, C2038 и A2062 (*E.coli*). Изучение нуклеотидной последовательности в данном регионе генома возбудителя позволяет выявлять микроорганизмы устойчивые к препаратам группы макролидов [6, 7, 10].

Некоторые препараты ряда фторхинолонов (моксифлоксацин) обладают высокой активностью в отношении *M. genitalium* и считаются препаратами выбора при неэффективности элиминации возбудителя с применением препаратов ряда макролидов. Антибактериальная активность фторхинолонов связана с их ингибирующим воздействием на ДНК-гиразу (состоящую из двух GyrA и двух GyrB субъединиц), и топоизомеразу IV (состоящую из двух ParC и двух ParE субъединиц). Мутации в генах gyrA, gyrB, parC и parE обуславливают формирование устойчивости возбудителя к действию антибактериальных препаратов ряда фторхинолонов [8, 15].

Целью проведенного исследования было изучить присутствие у клинических изолятов *M. genitalium* генетических маркеров устойчивости к группам антибактериальных препаратов, применяемых при лечении инфекций урогенитального тракта, обусловленных присутствием данного возбудителя.

Материалы и методы. Группу исследования составили беременные с осложнениями течения беременности (угроза прерывания беременности, фетоплацентарная недостаточность, анемия, гестоз, преждевременное старение плаценты). Все пациентки были обследованы на наличие ИППП методом ПЦР в режиме реального времени (ПЦР-РВ). В качестве биологического материала для выполнения исследований методом ПЦР-РВ использовали соскобы эпителиальных клеток из уретры и цервикального канала. По результатам проведенного исследования были отобраны образцы с моно-*M. genitalium*-инфекцией (n=34). В данных клинических изолятах проводили определение генетических маркеров устойчивости *M. genitalium* к трем группам антибактериальных препаратов: тетрациклины, макролиды, фторхинолоны.

Для определения устойчивости *M. genitalium* к антибактериальным препаратам группы тетрациклинов было проведено выявление tet-детерминант в геноме возбудителя. Исследование проводилось с применением метода класси-

ческой ПЦР с электрофоретическим форматом детекции.

Для амплификации фрагмента гена использовались праймеры:

tet-f – 5'- GGMCAYRTGGATTTWYTAGC-3' (forward);
tet-r – 5'- TCAGMCGGAGTRCTARCAAGGRC-3' (reverse).
амплифицируемый фрагмент включал 1 315 п.о. [9].

Для проведения амплификации в каждую пробирку объемом 0,5 мл добавляли 30 мкл амплификационной смеси: 5 мкл деионизированной воды, 20 мкл Taq PCR Master Mix (QIAGEN) и 5 мкл смеси, содержащей 25 рмоль/мкл каждого праймера. Добавляли 25 мкл минерального масла. Под слой масла вносили 10 мкл анализируемого образца, а в пробирку отрицательного контроля 10 мкл деионизированной воды. Амплификацию проводили с использованием термоциклера «Терцик» («ДНК-технология», РФ) по следующей программе: 95°C - 4 мин; 45 циклов – 95°C - 30 с, 52°C - 30 с, 72°C - 30 с.

Полученные ампликоны анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле, содержащем 1% бромистый этидий. При этом определяли наличие специфического фрагмента амплификации на уровне 1 315 п.о.

При положительном результате амплификации фрагмента tet-детерминанты (1 315 п.о.) делали заключение о наличии у *M. genitalium* устойчивости к антибактериальным препаратам группы тетрациклинов, а при отсутствии амплификации данного фрагмента - о чувствительности возбудителя к антибактериальным препаратам данной группы.

Для определения устойчивости *M. genitalium* к антибактериальным препаратам группы макролидов было проведено выявление нуклеотидных замен в гене 23S рРНК возбудителя. Исследование проводилось с применением секвенирующей ПЦР.

Для амплификации фрагмента гена использовались праймеры:

M.g.23S f- 5'- CCATCTCTTGACTGTCTCGGCTAT -3' (forward)
M.g.23S r- 5'- CCTACCTATTCTCTACATGGTGGTGT -3' (reverse),

амплифицируемый фрагмент включал 147 п.о.

Для проведения амплификации в каждую пробирку объемом 0,5 мл добавляли 30 мкл амплификационной смеси: 5 мкл деионизированной воды, 20 мкл Taq PCR Master Mix (QIAGEN) и 5 мкл смеси, содержащей 25 рмоль/мкл каждого праймера. Добавляли 25 мкл минерального масла. Под слой масла вносили 10 мкл анализируемого образца, а в пробирку отрицательного контроля 10 мкл деионизированной воды. Амплификацию проводили с использованием термоциклера «Терцик» («ДНК-технология», РФ) по следующей программе: 95°C - 5 мин; 45 циклов – 95°C - 15 с, 60°C - 60 с.

Полученные ампликоны анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле, содержащем 1% бромистый этидий. При этом определяли наличие специфического фрагмента амплификации на уровне 147 п.о.

Далее амплифицированные фрагменты ДНК подвергали очистке с использованием набора PCR Gel Extraction kit (QIAGEN), а затем проводили секвенирующую ПЦР с использованием набора BigDye Terminator v3.1 (Applied biosystems) и прямого (forward) праймера (M.g.23S f). Полученные фрагменты ДНК подвергали очистке с использованием DyeEx 2.0 Spin Kit (QIAGEN) и последующему электрофоретическому анализу на генетическом анализаторе ABI Prism 310 (Applied biosystems).

Для выявления мутаций в генах ответственных за появление устойчивости к препаратам группы фторхинолонов были проведены амплификация и определение последовательности генов gyrA и parC.

Для амплификации фрагментов генов использовались праймеры:

gyrA F- 5'- CGTCGTGTTCTTTATGGTGC-3' (forward),
gyrA R- 5'-ATAACGAAGTGCAGCAGGTC -3' (reverse),
длина амплифицируемого фрагмента – 230 п.о.

parC F- 5'-TGGGCTTAAACCCACCACT -3' (forward),
parC R- 5'-CGGGTTTCTGTGTAACGCAT -3' (reverse),
длина амплифицируемого фрагмента – 319 п.о.

Реакции амплификации проводились в отдельной пробирке для каждого из изучаемых генов, состав амплификационной смеси был аналогичен составу смеси для гена 23S рРНК (см. выше). Амплификацию проводили с использованием термоциклера «Терцик» («ДНК-технология», РФ) по следующей программе: 95°C - 5 мин; 45 циклов – 95°C - 15 с, 60°C - 15 с, 72°C - 15 сек.

Полученные ампликоны анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле, содержащем 1% бромистый этидий. При этом определяли наличие специфических фрагментов амплификации на уровне 230 п.о. (*gyrA*) и 319 п.о. (*parC*).

Далее проводили очистку и сиквенс-анализ полученных фрагментов в соответствии с описанной выше методикой для гена 23S рРНК, с использованием прямых (forward) праймеров (*gyrA* F и *parC* F) для соответствующих генов.

Результаты и обсуждение

Выявление tet-детерминант устойчивости *M. genitalium* к препаратам тетрациклинового ряда проводили в 34 клинических образцах содержащих ДНК *M. genitalium*. Анализ полученных в ходе исследования результатов, позволил установить, что в 18 образцах (52,94%) присутствовали tet-детерминанты устойчивости. Это позволяет сделать вывод о широкой распространенности штаммов *M. genitalium* устойчивых к действию препаратов тетрациклинового ряда. Таким образом, назначение препаратов тетрациклинового ряда без проведения предварительного анализа чувствительности-устойчивости возбудителя может быть не эффективным более чем в 50% случаев.

Проведение исследований с использованием секвенирующей ПЦР позволило обнаружить изменения в последовательностях нуклеотидов в V домене гена 23S рРНК у исследованных клинических изолятов *M. genitalium*. Наличие нуклеотидных замен в данном гене обуславливает формирование у *M. genitalium* резистентности к антибактериальным препаратам группы макролидов. В ходе проведения исследования было проанализировано 34 клинических образца содержащих ДНК *M. genitalium*. Анализ полученных в ходе исследования результатов, позволил установить, что в 9 образцах (26,47%) присутствовали нуклеотидные замены.

В позиции 2059 нуклеотидные замены были выявлены в 17,65% (n=6) случаев: при этом в 11,77% (n=4) случаев – замена A→G; в 2,94% (n=1) случаев – A→C; в 2,94% (n=1) случаев – A→T. В позиции 2058 было обнаружено 5,88% (n=2) случаев замен A→G. В 2,94% (n=1) случаев было обнаружено одновременно 2 нуклеотидные замены в одном образце в позициях 2058 A→G и 2038 C→T.

В ходе проведения исследования в клинических изолятах *M. genitalium* были выявлены генетические маркеры устойчивости к антибактериальным препаратам группы макролидов (нуклеотидные замены). Распространенность штаммов возбудителя резистентных к препаратам группы макролидов может являться как следствием неудачной попытки элиминации возбудителя препаратами группы макролидов в прошлом, так и следствием циркуляции антибиотикорезистентных штаммов инфекционного агента в популяции. Полученные результаты позволяют сделать вывод, что эмпирическое назначение антибактериальных препаратов группы макролидов в 26,47% случаев может быть не эффективным, и, как следствие, не приводит к элиминации возбудителя из организма пациента.

После анализа результатов секвенирующей ПЦР фрагментов генов *gyrA* и *parC* было установлено, что из 34 образцов *M. genitalium* в 2 (5,88%) присутствовали мутации в гене *parC*. Нуклеотидные замены были выявлены в положении

259 – замена G→T, а также в положении 242 C→A. В гене *gyrA* мутаций выявлено не было. В соответствии с данными полученными при последующем анализе полученных результатов нуклеотидная замена в положении 259 (G→T) гена *parC* приводила к аминокислотной замене в аминокислотной последовательности, тогда как нуклеотидная замена в положении 242 (C→A) гена *parC* не приводила к изменениям в аминокислотной последовательности соответствующего полипептида (молчащая мутация).

Таким образом, применение метода секвенирующей ПЦР позволило провести анализ генетических маркеров (гены *gyrA* и *parC*), обуславливающих возникновение резистентности у *M. genitalium* к препаратам группы фторхинолонов, и установить, что распространенность резистентных штаммов возбудителя находится на уровне 5,88%. Было показано, что циркулирующие штаммы *M. genitalium* несут точечные мутации в генах (*parC*), продукты которых являются мишенями для действия фторхинолонов, при этом, было также установлено, что нуклеотидные замены не всегда приводят к аминокислотным заменам, т.е. для оценки устойчивости возбудителя к антибактериальным препаратам группы фторхинолонов необходимо ориентироваться не только на наличие изменений в нуклеотидной цепочке, но и проводить последующий анализ с реконструкцией аминокислотной последовательности.

Полученные в ходе проведения исследования данные позволили подтвердить широкую распространенность штаммов *M. genitalium* устойчивых к антибактериальным препаратам группы тетрациклинов. Был проведен анализ распространенности штаммов возбудителя устойчивых к антибактериальным препаратам групп макролидов и фторхинолонов в клинических изолятах *M. genitalium*. Результаты исследования хорошо согласуются с литературными данными по распространенности антибиотикорезистентных штаммов *M. genitalium*. Полученные данные позволяют сделать вывод о необходимости проведения исследований направленных на выявление генетических маркеров устойчивости *M. genitalium* к антибактериальным препаратам до назначения антибактериальной терапии. Выбор лечебной тактики без предварительного проведения молекулярно-биологического анализа по определению устойчивости *M. genitalium* к действию антибиотиков может приводить к переходу инфекционного процесса в хроническую форму, а также к формированию и распространению антибиотикорезистентных штаммов возбудителя.

Литература

1. Доршевич, В.В., Андреева Н.Л., Руденкова Т.В., Костюк С.А., Марковская Т.В. Особенности течения беременности на фоне инфекций урогенитального тракта, обусловленных *Mycoplasma genitalium*. *ARS medica*. – 2011. – №14 (50). – С.147.
2. Прозоровский, С.В., Раковская И.В., Вульфвич Ю.В. Медицинская микоплазмология. – М.: Медицина. – 1995.
3. Руденкова, Т.В., Костюк С.А., Глинкина Т.В., Кулага О.К. Оценка риска инфицирования новорожденных при моно- и микстинфекциях урогенитального тракта у родильниц. *ARS medica*. 2011. – №15 (51). – С.315-317.
4. Шиманская, И. Г. Клинические протоколы диагностики и лечения инфекций, передаваемых половым путем. Минск. – 2009. – 88с.
5. Bjornelius, E. Antibiotic treatment of symptomatic *Mycoplasma genitalium* infection in Scandinavia : a controlled clinical trial. *Sexually Transmitted Infections*. – 2008. – Vol. 84. – P. 72–76.
6. Bradshaw, C. S. Azithromycin failure in *Mycoplasma genitalium* urethritis. *Emergency Infectious Disease*. – 2006. – Vol. 2. – P.1149–1152.
7. Chrismet, D. Detection of macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* in France. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2012. – Vol. 67 (11). – P. 2598-2601.
8. Deguchi, T. Analysis of the *gyrA* and *parC* genes of *Mycoplasma genitalium* detected in first-pass urine of men with non-gonococcal urethritis before and after fluoroquinolone treatment. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. – 2001. – Vol. 48. – P. 742-744.

Оригинальные научные публикации



9. *Falk, L., Fredlund H., Jensen J. S.* Tetracycline treatment does not eradicate *Mycoplasma genitalium*. *Sexually Transmitted Infections*. – 2003. – Vol. 79. – P. 318–9.

10. *Hamasuna, R., Osada, Y., Jensen, J. S.* Antibiotic susceptibility testing of *Mycoplasma genitalium* by Taq Man 5 nuclease real-time PCR. *Antimicrobe Agents and Chemotherapy*. – 2005. – Vol. 49. – P. 4993–4998.

11. *Hamasuna, R., Osada, Y., Jensen, J. S.* Isolation of *Mycoplasma genitalium* from first-void urine specimens by coculture with Vero cells. *Journal of Clinical Microbiology*. – 2007 – Vol. 45. – P. 847–50.

12. *Jensen, J.S.* Polymerase chain reaction for detection of

Mycoplasma genitalium in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*. – 1991. – Vol. 29. – P. 46-50.

13. *Pich, O. Q.* Comparative analysis of antibiotic resistance gene markers in *Mycoplasma genitalium*: application to studies of the minimal gene complement. *Microbiology*. – 2006. – Vol. 152. – P. 519–527.

14. *Tully, J. G.* A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. *Lancet*. – 1981. – Vol. 1. – P. 1288-1291.

15. *Yamaguchi, Y.* Contribution of topoisomerase IV mutation to quinolone resistance in *Mycoplasma genitalium*. *Antimicrobe Agents and Chemotherapy*. – 2013. – Vol. 10. – P. 1956–1971.

Поступила 10.06.2013 г.