

Т.В. Руденкова¹, О.К. Кулага², С.А. Костюк¹, Ю.А. Шишпоренок³, Л.В. Рубаник³

ИЗУЧЕНИЕ УСТОЙЧИВОСТИ-ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ MYCOPLASMA GENITALIUM К АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫМ ПРЕПАРАТАМ

ГУО «Белорусская медицинская академия последипломного образования»¹

УО «Белорусский государственный медицинский университет»²

РНПЦ эпидемиологии и микробиологии³

Выделенные и накопленные штаммы *Mycoplasma genitalium*: МГ-9 и МГ-20 были использованы для изучения устойчивости-чувствительности возбудителя к применяемым группам антибактериальных препаратов (тетрациклины, макролиды, фторхинолоны), с использованием метода серийных разведений. Результаты оценивали по проявлению роста и изменению цвета рН-индикатора питательной среды, с определением минимальной ингибирующей концентрации антибактериальных препаратов. Все исследованные антимикробные препараты позволили достичь угнетения роста штаммов МГ-9 и МГ-20 *M. genitalium*. При использовании препаратов группы макролидов угнетение роста возбудителя достигается с использованием более низких концентраций препаратов. Использование метода количественной ПЦР в режиме реального времени для контроля роста возбудителя в культуральной среде позволило установить, полное угнетение роста *M. genitalium* с использованием минимальных ингибирующих концентраций антибактериальных препаратов *in vitro* было достигнуто к 15-20 дню эксперимента.

Ключевые слова: *Mycoplasma genitalium*, среда для культивирования, антибактериальные препараты, устойчивость-чувствительность.

T. V. Rudenkova¹, O.K. Kulaga², S.A. Kostyuk¹, Yu.A. Shishporenok³, L.V. Rubanik³ STUDY OF MYCOPLASMA GENITALIUM RESISTANCE-SENSITIVITY TO ANTIBACTERIAL MEDICINES

Isolated and accumulated *Mycoplasma genitalium* isolates: MG-9 and MG-20 have been used for studying of the causative agent resistance -sensitivity to applied groups of antibacterial medicines (tetracyclines, macroleads, fluoroquinolones), with using of serial dilutions method. Results were estimated due to growth rising and culture medium pH-indicator colour changing, with identification of the antibacterial medicines minimum inhibitory concentrations. All investigated antimicrobial medicines have allowed to reach MG-9 and MG-20 *M. genitalium* isolates growth depression. Using of macroleads group medicines infectious agent growth reduction was reached with applying of lower medicines concentration. Quantitative real-time PCR method was used for the pathogen growth in culture medium control, it has allowed to establish that full *M. genitalium* isolates growth suppression with minimum inhibitory concentration of antibacterial medicines using *in vitro* has been reached to 15-20 day of experiment.

Key words: *Mycoplasma genitalium*, culture medium, antibacterial medicines, resistance -sensitivity.

На основании проведенных исследований с использованием метода серийных разведений и ПЦР-анализа изучены устойчивость-чувствительность двух штаммов *Mycoplasma genitalium* к группам антибактериальных препаратов (тетрациклины, макролиды, фторхинолоны), применяемым для лечения инфекций, обусловленных присутствием данного возбудителя. Анализ полученных в ходе проведения исследования данных позволил установить, что изучаемые штаммы *M. genitalium* чувствительны ко всем антибактериальным препаратам, которые были использованы при выполнении эксперимента. При использовании препаратов группы макролидов, угнетение роста возбудителя достигалось с использованием более низких концентраций препаратов. Данные полученные при анализе роста возбудителя в культуральной среде с применением метода количественной ПЦР в режиме реального времени позволили установить, что *in vitro* полное угнетение роста *M. genitalium* минимальными ингибирующими концентрациями антибактериальных препаратов было достигнуто к 15-20 дню эксперимента.

Впервые возбудитель *Mycoplasma genitalium* (*M.*

genitalium) был описан в 1981 году, когда данный микроорганизм был выделен от двух из 13 мужчин с негонококковым уретритом [9]. *M. genitalium* является трудно культивируемым микроорганизмом, поэтому на сегодняшний день использование культурального метода для выявления *M. genitalium* является очень трудоемким и длительным и может занимать от нескольких недель до нескольких месяцев.

В связи со сложностями культивирования данного патогена при изоляции, накоплении и получении чистой культуры микроорганизма для изучения свойств возбудителя исследователям приходится сталкиваться с множеством препятствий. Для культивирования *M. genitalium* можно использовать как перевиваемые культуры клеток (Vero, McCoy, HeLa, III, Hep - 2 и др.) [3, 6], так и бесклеточные жидкие питательные среды (SP4) или добавлять в эти среды агар или агарозу [6].

Активное использование антибактериальных препаратов в терапии различных воспалительных заболеваний привело к росту числа антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов, что делает актуальным изучение феномена антибиотикорезистентности, а также

совершенствование методов определения устойчивости-чувствительности микроорганизмов к применяемым группам антибактериальных препаратов.

Механизмы, лежащие в основе устойчивости к антибиотикам можно условно разделить на три группы. Один из механизмов связан с морфологическими особенностями микроорганизмов, которые обуславливают невосприимчивость возбудителя к определенным группам антибактериальных препаратов. В основе второй группы механизмов устойчивости лежит наличие у микроорганизмов различных генетических детерминант, кодирующих белки, которые способны связываться с мишенью антибактериального препарата, либо ферментативно разрушать его, либо модифицировать клеточную мембрану, делая невозможным проникновение препарата в клетку. Третья группа механизмов формирования резистентности связана с возникновением точечных мутаций в генах, кодирующих мишени антибактериальных препаратов, а также кодирующих белки, участвующие в процессах клеточной проницаемости и обратного транспорта [1, 7].

Выявление микроорганизмов, устойчивых к антибактериальным препаратам, при инфекционных процессах обуславливает необходимость пересмотра лечебной тактики, что подразумевает увеличение дозы антибактериального препарата или его замену на препаратами других групп. В связи с этим обнаружение у возбудителей маркеров устойчивости к антибактериальным препаратам является не менее важной задачей, чем выявление инфекционных агентов, т.е. самих микроорганизмов в очаге инфекции [4].

Для лечения инфекций урогенитального тракта обусловленных присутствием *M. genitalium* в настоящее время применяют три группы антибактериальных препаратов: тетрациклины (доксикалин), макролиды (азитромицин, джозамицин, кларитромицин, эритромицин), фторхинолоны [2, 5, 10]. Необходимо учитывать, что успешное лечение урогенитальных инфекций, обусловленных присутствием *M. genitalium*, зависит от адекватного назначения антибактериальных препаратов с учетом лабораторных исследований, включающих определение чувствительности-устойчивости микрофлоры к антибиотикам.

Чаще всего для проведения антибактериальной терапии инфекций, обусловленных *M. genitalium*, назначают макролиды. Однако, по данным литературы, от 12 до 30 % пациентов являются носителями штаммов *M. genitalium* устойчивых к препаратам группы макролидов [8].

Целью проведенного исследования было изучить устойчивость-чувствительность выделенных штаммов *M. genitalium* к группам антибактериальных препаратов (тетрациклинов, макролидов и фторхинолонов), применяемым 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 био-

логического материала для выполнения исследований методом ПЦР-РВ использовали соскобы эпителиальных клеток из уретры и цервикального канала. По результатам проведенного исследования были отобраны образцы для проведения культуральных исследований.

Материалом для выполнения культуральных исследований также являлись соскобы эпителиальных клеток из цервикального канала и уретры пациенток. Мазки-соскобы забирались, транспортировались и культивировались в транспортной (ТС-Mg) и питательной (ПС-Mg) средах для транспортировки и культивирования *M. genitalium* собственного приготовления РНПЦ эпидемиологии и микробиологии. Среда была приготовлена на основании прописи ингредиентов, имеющих в литературе [3] в модификации с добавлением ростовых компонентов.

После внесения клинического материала в жидкую бесклеточную питательную среду (ПС-Mg) культивирование возбудителя осуществляли при +37°C. Для определения устойчивости возбудителя к антибактериальным препаратам использовали метод серийных разведений. Культивирование *M. genitalium* проводили в питательных средах с 2-кратным разведением антибактериальных препаратов (доксикалин, эритромицин, азитромицин, кларитромицин, левофлоксацин).

Результаты оценивали по изменению цвета рН-индикатора питательной среды от красной, красно-малиновой до желтой. В ходе проведения исследования проводили определение минимальных ингибирующих концентраций для изучаемых антибактериальных препаратов. При этом минимальная ингибирующая концентрация определялась как самая низкая концентрация антибактериального препарата, при которой не происходило изменение цвета культуральной среды.

Размножение *M. genitalium* в культуре также отслеживали по росту числа копий ДНК возбудителя в культуральной среде, для чего проводили ПЦР-РВ с количественным форматом детекции («АмплиСенс-*Mycoplasma genitalium*-FL», РФ).

Результаты и обсуждение. Для первичного выделения *M. genitalium* проводилось внесение исследуемого соскобного материала в разработанную и модифицированную питательную среду «ПС-Mg», что позволило выделить и накопить два штамма *M. genitalium*: МГ-9 и МГ-20 в титрах 10^3 КОЕ/мл и 10^4 КОЕ/мл соответственно. Эти изоляты были использованы для изучения устойчивости-чувствительности возбудителя к применяемым группам антибактериальных препаратов (тетрациклины, макролиды, фторхинолоны) с применением культурального метода и количественной ПЦР-РВ.

Для проведения эксперимента были выбраны часто применяемые антибактериальные препараты: тетрациклины – доксицилин; макролиды – эритромицин, азитромицин, кларитромицин; фторхинолоны – левофлоксацин. Все антибактериальные препараты добавляли в бесклеточную среду для культивирования *M. genitalium* «ПС-Mg» в концентрациях 0,001 до 2,0 мг/л (по 12 разведений для каждого препарата).

В качестве контрольных образцов использовали штаммы МГ-9 и МГ-20 культивируемые с использованием среды «ПС-Mg» без добавления антибактери-

Оригинальные научные публикации

Таблица 1. Результаты определения минимальных ингибирующих концентраций антибактериальных препаратов для штаммов МГ-9 и МГ-20 *M. genitalium*

Препарат	МИК (мг/л)	
	МГ-9	МГ-20
доксциклин	0,5	1,0
эритромицин	0,125	0,25
азитромицин	0,002	0,002
klarитромицин	0,031	0,063
левофлоксацин	0,5	1,0

Таблица 2. Результаты определения уровня ингибирования роста возбудителя антибактериальными препаратами для штамма МГ-9 *M. genitalium*

концентрация препарата	5 дней	10 дней	15 дней	20 дней
концентрация МГ-9 в контрольной культуре ($\times 10^2$)	6,1	9,3	10,1	12,8
доксциклин 0,5	37,4	87,5	92,3	99,8
эритромицин 0,125	26,1	42,3	84,7	99,9
азитромицин 0,002	76,9	84,2	93,5	99,7
klarитромицин 0,031	41,7	69,3	87,7	99,9
левофлоксацин 0,5	31,2	78,2	99,8	-

Таблица 3. Результаты определение уровня ингибирования роста возбудителя антибактериальными препаратами для штамма МГ-20 *M. genitalium*

концентрация препарата	5 дней	10 дней	15 дней	20 дней
концентрация МГ-20 в контрольной культуре ($\times 10^3$)	2,9	8,1	15,6	21,1
доксциклин 1,0	31,8	78,4	97,1	99,9
эритромицин 0,25	36,7	63,8	81,6	99,9
азитромицин 0,002	78,8	89,1	99,7	-
klarитромицин 0,063	54,3	75,1	81,9	99,8
левофлоксацин 1,0	72,2	88,7	99,9	-

альных препаратов, рост возбудителя в которых отслеживали по изменению цветового индикатора среды и росту числа копий ДНК *M. genitalium* (количественная ПЦР-РВ).

В контрольной культуре МГ-20 *M. genitalium* на 13 день эксперимента было зарегистрировано изменение цвета рН-индикатора питательной среды от красной, красно-малиновой до желтой, а в контрольной культуре МГ-9 *M. genitalium* изменение цвета индикатора было

зарегистрировано на 16 день. Различные сроки роста возбудителя в культуре можно объяснить изначально различными концентрациями *M. genitalium* в исходных накопленных культурах штаммов МГ-9 и МГ-20 (10^3 КОЕ/мл и 10^4 КОЕ/мл. соответственно). Таким образом, определение минимальных ингибирующих концентраций антибактериальных препаратов проводили на 13 день эксперимента для штамма МГ-20 *M. genitalium* и на 16 день – для штамма МГ-9 *M. genitalium*. Полученные результаты по определению минимальных ингибирующих концентраций для изученных антибактериальных препаратов представлены в таблице 1.

В результате анализа полученных при выполнении эксперимента данных было установлено, что все исследованные антибактериальные препараты позволили достичь угнетения роста штаммов МГ-9 и МГ-20 *M. genitalium*. При этом минимальные ингибирующие концентрации варьировали в пределах от 0,002 мг/л (для азитромицина) до 1,0 мг/л (для доксициклина и левофлоксацина). Для азитромицина минимальная ингибирующая концентрация была определена на уровне 0,002 мг/л для обоих штаммов возбудителя; для klarитромицина – на уровне 0,031 мг/л для штамма МГ-9 и 0,063 мг/л для штамма МГ-20; для эритромицина – на уровне 0,125 мг/л для штамма МГ-9 и 0,25 мг/л для штамма МГ-20; для доксициклина и левофлоксацина – на уровне 0,5 мг/л для штамма МГ-9 и 1,0 мг/л для штамма МГ-20. Полученные более низкие значения минимальных ингибирующих концентраций для штамма МГ-9 *M. genitalium* можно объяснить тем, что концентрация возбудителя в накопленной культуре изначально была ниже (10^3 КОЕ/мл), чем в культуре штамма МГ-20 *M. genitalium* (10^4 КОЕ/мл).

Таким образом, в ходе проведения эксперимента, с использованием культурального метода удалось установить, что выделенные штаммы *M. genitalium* (МГ-9 и МГ-20) чувствительны ко всем применяемым группам антибактериальных препаратов (тетрациклины, макролиды, фторхинолоны), однако при применении препаратов группы макролидов угнетение роста возбудителя достигается с использованием более низких концентраций препаратов.

Контроль роста возбудителя в среде проводился также с использованием метода количественной ПЦР-РВ. При этом расчет уровня ингибирования роста *M. geni*

$$\% \text{ ингибирования} = \frac{\text{концентрация ДНК}_{\text{контр}} - \text{концентрация ДНК}_{\text{исслед}}}{\text{концентрация ДНК}_{\text{контр}}} \times 100\%$$

где

% ингибирования – уровень ингибирования роста *M. genitalium* в процентах,

концентрация ДНК_{контр} – концентрация ДНК *M. genitalium* в контрольной культуре (без добавления антибактериального препарата);

концентрация ДНК_{исслед} – концентрация ДНК *M. genitalium* в исследуемой культуре (с добавлением антибактериального препарата в определенной концентрации).

Определение концентраций ДНК *M. genitalium* в контрольной и исследуемых культурах проводили на 5, 10, 15 и 20 дни выполнения экспериментальных исследований. По полученным в ходе выполнения количественной ПЦР-РВ данным был проведен расчет уров-

ня ингибирования роста штаммов МГ-9 и МГ-20 *M. genitalium* антибактериальными препаратами. Результаты, полученные при расчете уровня ингибирования роста возбудителя для минимальных ингибирующих концентраций каждого из тестируемых антибактериальных препаратов, представлены в таблицах 2 – 3.

На основании результатов полученных с применением количественной ПЦР-РВ было установлено, что полное (100%) угнетение роста изучаемых штаммов *M. genitalium* (МГ-9 и МГ-20) с использованием минимальных ингибирующих концентраций антибактериальных препаратов *in vitro* было достигнуто к 15-20 дню эксперимента. Полученные результаты подтверждают необходимость рационального подхода не только при выборе антибактериального препарата и его дозировки при лечении инфекций уrogenитального тракта, обусловленных присутствием *M. genitalium*, но также и при определении оптимальных сроков применения антибактериального препарата для успешной элиминации возбудителя и исключения возможности рецидивов инфекции или ее перехода в хроническую форму.

Таким образом, проведенное изучение устойчивости-чувствительности выделенных штаммов *M. genitalium* (МГ-9 и МГ-20) с применением культурального метода и количественной ПЦР-РВ, позволило установить, что все применяемые для лечения инфекций уrogenитального тракта, обусловленных *M. genitalium*, группы антибактериальных препаратов (тетрациклины, макролиды, фторхинолоны) позволяют достичь угнетения роста возбудителя *in vitro*. При этом минимальные ингибирующие концентрации для исследованных препаратов находятся в пределах от 0,002 мг/л (макролиды) до 1,0 мг/л (тетрациклины, фторхинолоны), что подтверждает высокую активность

и эффективность антибактериального действия препаратов группы макролидов в отношении *M. genitalium*.

Применение метода количественной ПЦР-РВ позволило установить, что абсолютное угнетение роста *M. genitalium in vitro* достигается к 15-20 дню эксперимента, что подтверждает необходимость адекватного выбора длительности применения антибактериального препарата для полной элиминации инфекционного агента.

Литература

1. Прозоровский, С.В., Раковская И.В., Вульфович Ю.В. Медицинская микоплазмология. – М.: Медицина. – 1995.
2. Шиманская, И. Г. Клинические протоколы диагностики и лечения инфекций, передаваемых половым путем. Минск. – 2009. – 88с.
3. Baseman, J.B. Isolation and characterization of *Mycoplasma genitalium* strains from the human respiratory tract. *Journal of Clinical Microbiology*. – 1988 – Vol. 26. – P 2266–2269.
4. Falk, L., Fredlund H., Jensen J. S. Tetracycline treatment does not eradicate *Mycoplasma genitalium*. *Sexually Transmitted Infections*. – 2003. – Vol. 79. – P 318–9.
5. 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.
6. 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.
7. Jensen, J.S. Polymerase chain reaction for detection of *Mycoplasma genitalium* in clinical samples. *Journal of Clinical Microbiology*. – 1991. – Vol. 29. – P. 46-50.
8. Pereyre, S. In vitro selection and characterization of resistance to macrolides and related antibiotics in *Mycoplasma pneumoniae*. *Antimicrobe Agents and Chemotherapy*. – 2004. – Vol. 48. – P. 460–465.
9. Tully, J. G. A newly discovered mycoplasma in the human urogenital tract. *Lancet*. – 1981. – Vol. 1. – P 1288-1291.
10. Taylor-Robinson, D. Nongonococcal urethritis and antibiotic-resistant *Mycoplasma genitalium* infection. *Clinical infectious diseases*. – 2008. – Vol. 35. – P. 1554–1555.

Поступила 10.06.2013 г.