



Маджарова О.А.¹✉, Эйдельштейн И.А.², Абельская И.С.¹, Карпов И.А.³, Романов А.В.², Козлов Р.С.²

¹ Республиканский клинический медицинский центр Управления делами Президента Республики Беларусь, Минск, Беларусь

² Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии Смоленского государственного медицинского университета, Смоленск, Россия

³ Белорусский государственный медицинский университет, Минск, Беларусь

Разработка и оценка эффективности использования в лабораторной практике молекулярно-генетических методов одновременного выявления в биологическом материале *Mycoplasma genitalium* и маркеров ее резистентности к макролидам

Конфликт интересов: не заявлен.

Вклад авторов: концепция и дизайн исследования, редактирование, сбор материала, обработка, написание текста – Маджарова О.А.; концепция и дизайн исследования, редактирование, обработка данных – Эйдельштейн И.А.; анализ материала – Романов А.В.; концепция и организация проекта – Козлов Р.С., Абельская И.С., Карпов И.А.

Подана: 10.03.2025

Принята: 19.06.2025

Контакты: o.madzharova@mail.ru

Резюме

Цель. Оценить эффективность использования в лабораторной практике усовершенствованных технологий мультиплексного ПЦР-анализа для одновременного выявления в биологическом материале ДНК *M. genitalium* и мутаций в гене 23S рРНК, определяющих устойчивость микоплазмы к макролидам.

Материалы и методы. 33 образца ДНК *Mycoplasma genitalium* из города Минска Республики Беларусь исследовались на наличие в генетическом материале маркеров резистентности к макролидам. Тестирование проводилось при помощи двух технологий мультиплексного ПЦР-анализа в режиме реального времени, предназначенных для обнаружения в биологическом материале *M. genitalium* и мутаций в гене 23S рРНК, связанных с устойчивостью к макролидам. На базе центральной лаборатории (НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России, Смоленск) применялся метод ПЦР в варианте FRET (с резонансным переносом энергии флуоресценции) с последующим исследованием выявленных мутаций методом секвенирования по Сэнгеру. На базе ПЦР-лаборатории ГУ «Республиканский клинический медицинский центр» Управления делами Президента Республики Беларусь применялся метод ПЦР в варианте DPO (с двойным праймингом олигонуклеотида) для выявления ДНК *M. genitalium* с использованием тест-системы Allplex MG & AziR Assay (Seegene, Южная Корея).

Результаты. Тестирование образцов ДНК *Mycoplasma genitalium* при помощи технологии ПЦР-DPO подтвердило наличие ДНК *M. genitalium* в 97% образцов. Распространенность мутаций к макролидам составила 21,87%. Мутационный профиль



представлен двумя вариантами нуклеотидных замен в гене 23S рРНК *M. genitalium*: в позициях A2059G 9,38% и A2058G 12,5%. Тестирование образцов ДНК *Mycoplasma genitalium* с использованием технологии ПЦР-FRET подтвердило наличие ДНК *M. genitalium* в 78,7% образцов. Распространенность мутаций к макролидам составила 31%. Мутационный профиль представлен двумя вариантами нуклеотидных замен в гене 23S рРНК *M. genitalium*: в позиции A2059G (15,5%) и A2058G (15,5%). Нуклеотидные замены в позиции 2611 не были выявлены. В 87,5% образцов с констатированными мутациями результаты исследования с использованием ПЦР-FRET и ПЦР-DPO совпадают. Отмечено расхождение по одному варианту нуклеотидной замены в гене 23S рРНК в позиции A2059G.

Заключение. Внедрение в алгоритм диагностики микоплазменной инфекции, обусловленной *M. genitalium*, методов молекулярной диагностики для одновременного выявления в биологическом материале *Mycoplasma genitalium* и генетических маркеров резистентности к макролидам позволит урегулировать вопросы рационального назначения антибиотикотерапии и элиминации возбудителя.

Ключевые слова: *Mycoplasma genitalium*, макролиды, резистентность, антибактериальные препараты, мутации, 23S рРНК

Мажарова О.¹✉, Ейделштейн И.², Абелская И.¹, Карпов И.³, Романов А.², Козлов Р.²

¹ Republican Clinical Medical Center of the Administration of the President of the Republic of Belarus, Minsk, Belarus

² Institute of Antimicrobial Chemotherapy of the Smolensk State Medical University, Smolensk, Russia

³ Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Elaborating Molecular Genetic Methods for Simultaneous Detection of *Mycoplasma genitalium* and Markers of Its Resistance to Macrolides in Biological Material and Evaluating Their Effectiveness in Laboratory Practice

Conflict of interest: nothing to declare.

Authors' contribution: study concept and design, editing, material collection, processing, text writing – Majarova O.; study concept and design, editing, processing – Eidelstein I.; material analyzing – Romanov A.; project concept and management – Kozlov R., Abelskaya I., Karpov I.

Submitted: 10.03.2025

Accepted: 19.06.2025

Contacts: o.madzharova@mail.ru

Abstract

Purpose. To evaluate the effectiveness of using improved multiplex PCR analysis technologies in laboratory practice for simultaneous detection of *M. genitalium* DNA and mutations in the 23S rRNA gene that determine mycoplasma resistance to macrolides in biological material.

Materials and methods. 33 *Mycoplasma genitalium* DNA samples from Minsk, Republic of Belarus, were tested for the presence of macrolide resistance markers in their genetic material. The testing was performed using two real-time multiplex PCR assays designed to detect *M. genitalium* and mutations in the 23S rRNA gene associated with macrolide resistance in biological material. The central laboratory (Research Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk State Medical University, Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Smolensk) used the FRET (fluorescence resonance energy transfer) PCR method, followed by testing the identified mutations using Sanger sequencing. The PCR laboratory of the Republican Clinical Medical Center within the Office of the President of the Republic of Belarus applied the DPO (double oligonucleotide priming) PCR method to detect *M. genitalium* DNA using the Allplex MG&AziR Assay test system (Seegene, South Korea).

Results. Testing of *Mycoplasma genitalium* DNA samples using PCR-DPO technology confirmed the presence of *M. genitalium* DNA in 97% of samples. The prevalence of macrolide mutations was 21.87%. The mutational profile was represented by two variants of nucleotide substitutions in the 23S rRNA gene of *M. genitalium*: at positions A2059G and A2058G with 19.38% and 2.5%, respectively. Testing of *Mycoplasma genitalium* DNA samples using PCR-FRET technology confirmed the presence of *M. genitalium* DNA in 78.7% of samples. The prevalence of macrolide mutations was 31%. The mutational profile was represented by two variants of nucleotide substitutions in the 23S rRNA gene of *M. genitalium*: at positions A2059G (15.5%) and A2058G (15.5%). Nucleotide substitutions at position 2611 were not detected. In 87.5% of samples with detected mutations, the results of the study using PCR-FRET and PCR-DPO were consistent. A discrepancy was noted for one variant of nucleotide substitution in the 23S rRNA gene at position A2059G.

Conclusion. Implementing molecular diagnostic methods into the algorithm of diagnosing mycoplasma infection caused by *M. genitalium* for simultaneous detection of *Mycoplasma genitalium* and genetic markers of macrolide resistance in biological material will resolve the issues of rational administration of antibiotic therapy and elimination of the pathogen.

Keywords: *Mycoplasma genitalium*, macrolides, resistance, antibacterial drugs, mutations, 23S rRNA

■ ВВЕДЕНИЕ

Mycoplasma genitalium вызывает инфекции, передающиеся половым путем (ИППП) [1]. Принадлежность возбудителя к группе облигатных патогенов, приводящих к развитию патологических процессов в органах мочеполовой системы, предусматривает определенный алгоритм диагностики: идентификация и назначение терапии в соответствии с чувствительностью к антибактериальным препаратам. Важно учитывать, что особенности биологии развития *M. genitalium* обуславливают алгоритм этиологической диагностики и терапии данного возбудителя.

В настоящее время процесс обнаружения *M. genitalium* в биологическом материале пациента не вызывает затруднений. Внедрение в практику лабораторий методов молекулярной диагностики ускорило процесс выявления этиологического фактора. В Европейском руководстве по ведению инфекций, вызванных *M. genitalium* (2021 г.),



метод амплификации нуклеиновых кислот (МАНК) рекомендован как единственно эффективный, позволяющий идентифицировать специфическую нуклеиновую кислоту (НК) *M. genitalium* в образцах биологического материала [2]. В Республике Беларусь рутинная этиологическая диагностика *M. genitalium* также основывается на применении метода полимеразной цепной реакции (ПЦР), который включен в алгоритмы диагностики, представленные в клинических протоколах Министерства здравоохранения Республики Беларусь [3–5].

Эффективное лечение *M. genitalium*-инфекции является приоритетной задачей вследствие активно формирующейся устойчивости к антибиотикам, применяемым для элиминации возбудителя. К препаратам первой линии терапии относятся макролиды [2, 6, 7]. В последнее время особую актуальность приобретает проблема растущего уровня резистентности к макролидам у *M. genitalium*, о чем свидетельствуют данные Глобального систематического обзора с метаанализом (Machalek D.A. et al., 2020) [8]. Установлена генетическая природа механизмов антибиотикорезистентности (Parnham et al., 2014). Тестирование *M. genitalium* на наличие генетических маркеров резистентности позволяет выявлять штаммы, устойчивые к данной группе препаратов, и корректировать терапию в соответствии со статусом возбудителя. К настоящему времени ряд зарубежных документов, регламентирующих алгоритм диагностики и лечения микоплазменной инфекции, обусловленной *M. genitalium*, пересмотрен в пользу применения технологий тестирования на наличие генетических маркеров резистентности к антибактериальным препаратам [6, 7].

В Республике Беларусь для лечения неосложненных форм урогенитальных заболеваний, обусловленных *M. genitalium*, предлагаются к использованию, наряду с доксициклином, схемы терапии азитромицином [3]. В клиническом протоколе оказания медицинской помощи пациентам с ИППП рекомендации по тестированию возбудителя на маркеры антибиотикорезистентности отсутствуют. Следует отметить, что в учебно-методическом пособии по диагностике и терапии *M. genitalium*-инфекции предлагается проводить тестирование *M. genitalium* на маркеры резистентности к макролидам только лишь в случае неэффективности проводимой антибактериальной терапии [9]. Примечательно, что для диагностики генетических маркеров резистентности предлагается применение методов молекулярно-биологического анализа (секвенирующая ПЦР) [9], что до известного времени в условиях повседневной лабораторной практики осуществить было невозможно в силу отсутствия зарегистрированных министерствами здравоохранения Республики Беларусь и Российской Федерации коммерческих тест-систем.

Специалисты Всемирной организации здравоохранения в рамках Глобальной стратегии сектора здравоохранения по инфекциям, передаваемым половым путем, на период 2022–2030 гг. в отношении *M. genitalium* рекомендуют проводить мониторинг антибиотикорезистентности и неудач в терапии. Результаты эпидемиологического надзора должны использоваться для регулярного обновления национальных клинических рекомендаций и политики в области лечения [10]. К настоящему времени клинический протокол оказания медицинской помощи пациентам с ИППП не учитывает эпидемиологическую ситуацию по антибиотикорезистентности *M. genitalium*; это вызвано тем, что мониторинг резистентности *M. genitalium* в Республике Беларусь не проводился.

Последние данные по уровню резистентности *M. genitalium* в стране были опубликованы в 2013 году. Частота распространения маркеров антибиотикорезистентности к макролидам в клинических изолятах *M. genitalium* от беременных женщин (n=34) составляла 26,47% (9/34). Как видно, уже на тот период проблема антибиотикорезистентности была актуальна для Республики Беларусь [11].

К настоящему времени ранее предложенные к использованию в Республике Беларусь алгоритмы диагностики и терапии *M. genitalium*-инфекции требуют совершенствования. Современный алгоритм ведения пациентов с *M. genitalium*-инфекцией должен учитывать результаты частоты встречаемости и характер мутаций, определяющих резистентность возбудителя к антибиотикам.

С 2022 года Республика Беларусь принимает участие в многоцентровом проекте России DeMaRes (Detection of Macrolide Resistance – *Mycoplasma genitalium* – Анализ распространенности мутаций резистентности к макролидам у *Mycoplasma genitalium*). Исследование по изучению спектра и распространенности маркеров резистентности к макролидам у *M. genitalium* осуществляется в рамках совместного научно-исследовательского сотрудничества в сфере медицинской науки между учреждением образования «Смоленский государственный медицинский университет» (СГМУ) Министерства здравоохранения Российской Федерации и государственным учреждением «Республиканский клинический медицинский центр» Управления делами Президента Республики Беларусь (ГУ РКМЦ).

Участие Республики Беларусь в проекте DeMaRes с марта 2022 года по март 2024 года позволило определить частоту распространения мутаций резистентности к макролидам у *M. genitalium*, составившую 15,22% (49/322), и профиль генетических детерминант резистентности – A2059G 10,25% (33/322) и A2058G 4,97% (16/322). Все результаты, полученные в рамках проекта DeMaRes, депонированы и импортированы на онлайн-платформу для анализа и обмена данными по антибиотикорезистентности AMRcloud (<https://amrcloud.net/ru/project/demares/>).

Результаты мониторинга антибиотикорезистентности у *M. genitalium* демонстрируют необходимость повышения эффективности лечения. Это, в свою очередь, включает стратегии, ориентированные на исследование устойчивости, а также на создание новых противомикробных препаратов и подходов к комбинированию противомикробных препаратов, что может быть осуществлено путем внедрения ПЦР-системы по выявлению генетических маркеров антибиотикорезистентности.

В настоящем исследовании продемонстрирован опыт применения двух разработок мультиплексного ПЦР-анализа: в варианте FRET (с резонансным переносом энергии флуоресценции) и DPO (с двойным праймингом олигонуклеотида), предназначенных для обнаружения в биологическом материале *M. genitalium* и мутаций в гене 23S рРНК, связанных с устойчивостью к макролидам.

■ ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ

Оценить эффективность использования в лабораторной практике усовершенствованных технологий мультиплексного ПЦР-анализа для одновременного выявления в биологическом материале ДНК *M. genitalium* и мутаций в гене 23S рРНК, определяющих устойчивость микоплазмы к макролидам.



■ МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование по изучению одновременного выявления *M. genitalium* и генетических маркеров резистентности к макролидам было выполнено на 33 изолятах *M. genitalium*. Коллекция из 33 положительных образцов ДНК *M. genitalium* представлена из двух лабораторий г. Минска Республики Беларусь: УЗ «Минский городской клинический центр дерматовенерологии» и ГУ «Республиканский клинический медицинский центр» Управления делами Президента Республики Беларусь. Биологический материал, представленный соскобами со слизистых оболочек уретры (n=11) и цервикального канала (n=22), был получен от пациентов, обратившихся за медико-консультативной помощью к специалистам дерматовенерологам, гинекологам и урологам специализированных и многопрофильных медицинских учреждений Минска.

В лабораториях указанных учреждений здравоохранения клинический образец был классифицирован как положительный на основании первичного рутинного ПЦР-тестирования с использованием наборов реагентов, зарегистрированных на территории Республики Беларусь.

Выделение ДНК *M. genitalium* осуществлялось с использованием наборов «ДНК-сорб-АМ» (ФБУН ЦНИИ, Россия), «Проба-НК-Плюс и Проба-Рапид» («ДНК-технология», Россия). Выявление ДНК *M. genitalium* проводилось на основе технологии ПЦР с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме реального времени, для чего применялись наборы реагентов: «ПЛАЗМОГЕН-*Mg. Mycoplasma genitalium*» («ДНК-технология», Россия), «РеалБест ДНК *Chlamydia trachomatis / Mycoplasma genitalium*» («Вектор-Бест», Россия) и «АМПЛИСЕНС® *C. trachomatis / Ureplasma spp. / M. genitalium / M. hominis* – Мультипрайм – FL» (ФБУН ЦНИИ, Россия) – в моноплексном и мультиплексном формате, предназначенные для исследования пациентов на предмет выявления *M. genitalium*, а также для исследования микрофлоры урогенитального тракта у женщин и мужчин (Фемофлор® 16, Фемофлор® 8, Фемофлор® Скрин, Андрофлор®, Андрофлор® Скрин («ДНК-технология», Россия). Использовались регистрирующие амплификаторы ДТ-96 и ДТ-lite («ДНК-технология», Россия), Rotor-Gene Q (QIAGEN, Германия) и CFX96 Touch (Bio-Rad, США).

При обнаружении ДНК *M. genitalium* образцы аликвотировались и хранились при температуре –20 °С: одна часть аликвоты образца оставалась на базе ГУ РКМЦ, а другая передавалась в центральную лабораторию (НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России, Смоленск) для дальнейшего тестирования на наличие генетических маркеров резистентности к макролидам.

Выявление специфических мутаций макролидорезистентности

На базе НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Министерства здравоохранения России осуществлялся анализ с использованием модифицированного метода ПЦР в режиме реального времени с эффектом гашения флуоресценции зонда праймером (далее ПЦР-FRET) [12]. Разработанный метод обеспечивает возможность выявлять нуклеотидные замены в гене 23S рРНК *M. genitalium* в позициях 2058, 2059 и 2611 (согласно нумерации по *E. coli*). Постаmplификационный анализ температур плавления (T_m) (полученных пиков) опытных и контрольных образцов позволял сделать вывод о наличии мутации в исследуемом образце либо идентифицировать как «дикий» фенотип – без мутаций (рис. 1).

Во всех образцах ДНК *M. genitalium*, несущих мутации, в целях подтверждения характера нуклеотидных замен использовался метод секвенирования соответствующих фрагментов гена по Сэнгеру с применением наборов реагентов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и генетического анализатора Applied Biosystems 3500 (Life Technologies, США).

На базе ГУ «Республиканский клинический медицинский центр» Управления делами Президента Республики Беларусь осуществлялось тестирование образцов (n=33) на предмет выявления специфических мутаций макролидорезистентности с использованием технологии ПЦР-DPO (Allplex MG & AziR Assay (Seegene, Южная Корея). Набор реагентов предназначен для выявления в биологическом материале ДНК *M. genitalium* и 6 мутаций в гене 23S рРНК (A2058G, A2058C, A2058T, A2059G,

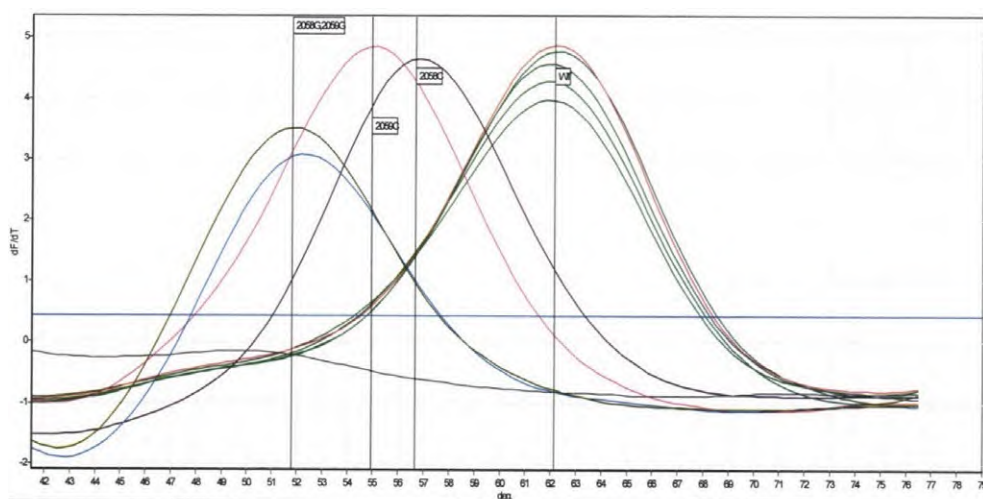


Рис. 1. Пример анализа 23S рРНК *M. genitalium* посредством оценки характера кривых плавления зондов после проведения ПЦР в режиме реального времени
Fig. 1. Example of the analysis of 23S rRNA *M. genitalium* by evaluating the melting curves of probes after real-time PCR

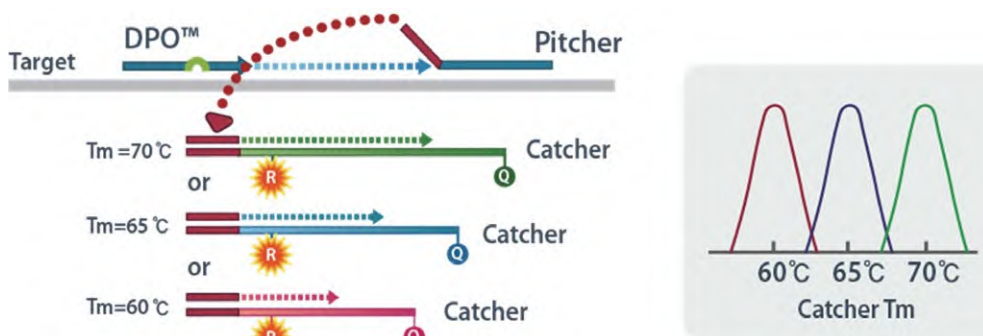


Рис. 2. Схема технологии TOCE™ (Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension)
Fig. 2. Technology diagram TOCE™ (Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension)



Рис. 3. Пример анализа 23S рННК *M. genitalium* с помощью программного обеспечения Seegene Viewer, версия 1.6
Fig. 3. Example of the analysis of 23S ribosomal ribonucleic acid *M. genitalium* using the Seegene Viewer software version 1.6

A2059C, A2059T), определяющих устойчивость к азитромицину. Выявление возбудителя и нуклеотидных замен основывалось на аналитической методике MuDT (Multiple Detection Temperatures), позволяющей получить значение мульти-Ct (порогового цикла) в одном канале флуоресценции при различных температурах обнаружения (72 °C и 60 °C) без анализа кривой плавления на приборе для ПЦР в режиме реального времени.

В основу принципов исследования MuDT положена методика TOCE™ (Tagging Oligonucleotide Cleavage and Extension) [13], в которой используется непрягая генерация сигнала за счет применения двух ключевых компонентов, пары праймеров DPO™ (ПЦР-DPO) – Pitcher и Catcher, обеспечивая таким образом высокоспецифичную амплификацию целевой области [13]. Pitcher как олигонуклеотид двойного назначения специфически связывается с ДНК-мишенью, а затем при помощи 5'-нуклеазы расщепляется с высвобождением немеченого компонента, который служит праймером для искусственной матрицы с двумя метками, – Catcher (рис. 2).

Высвобожденная часть гибридизируется с захватывающей частью устройства Catcher, в результате чего формируется дуплексный Catcher. Это, в свою очередь, приводит к удлинению Catcher и генерации сигнала флуоресценции, который напрямую коррелирует с количеством ДНК-мишени и может быть проанализирован в реальном времени (рис. 3) [13].

■ РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение двух технологий ПЦР-анализа для выявления специфических мутаций макролидорезистентности у *M. genitalium* было проведено на коллекции из 33 образцов ДНК *M. genitalium*, собранных по городу Минску. Биологический материал представлен мазками и соскобами из урогенитального тракта мужчин и женщин. Данный вид биологического материала рекомендован алгоритмом выявления

Таблица 1
Сравнительные характеристики показателей тест-систем для выявления специфических мутаций макролидорезистентности у *M. genitalium*
Table 1
Comparative characteristics of the indicators of test systems for the detection of specific mutations of macrolidoresistance in *M. genitalium*

Показатели	ПЦР-DPO Allplex MG & AziR Assay (Seegene, Южная Корея)	ПЦР-FRET Разработка НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России, Смоленск
Предел обнаружения: <ul style="list-style-type: none"> ■ <i>M. genitalium</i> ■ нуклеотидные замены в гене 23S рРНК <i>M. genitalium</i> 	10 ЦИЕ/мл 50 копий/реакция, 100 копий/реакция (A2059T)	Не менее 500 ГЭ/реакция Не менее 500 ГЭ/реакция
Спектр нуклеотидных замен гена 23S рРНК <i>M. genitalium</i> (согласно нумерации <i>E. coli</i>)	A2058G, A2058C, A2058T, A2059G, A2059C, A2059T	A2058G, A2058C, A2059G, A2059C, A2611G, C2611T, A2062T
Клиническая чувствительность	95%	97%
Метод выявления	ПЦР в режиме реального времени (технология MuDT с двойным праймингом олигонуклеотида)	ПЦР в режиме реального времени с эффектом гашения флуоресценции зонда праймером (технология FRET)
Биологический материал	Моча, урогенитальные мазки, образцы, предназначенные для жидкостной цитологии	Моча, урогенитальные мазки

Примечание: ГЭ – количество геномных эквивалентов клеток микроорганизмов; ЦИЕ – цветоизменяющие единицы в единице объема биологического образца.

M. genitalium согласно клиническим протоколам Республики Беларусь [3–5]. В структуре образцов превалировала доля соскобов цервикального канала женщин – 67% (22/33), на образцы соскобов урогенитального тракта мужчин пришлось 33% (11/33).

Представленные ранее методы молекулярно-генетического анализа валидированы разработчиками для исследования урогенитальных соскобов/мазков и мочи. В случае применения ПЦР-DPO возможен также вариант тестирования образцов, предназначенных для жидкостной цитологии.

Технические характеристики запатентованных методов представлены в табл. 1.

Оба метода представляют собой мультиплексный анализ ПЦР в режиме реального времени, который позволяет одновременно амплифицировать и обнаруживать не только мутации, но и саму целевую нуклеиновую кислоту *M. genitalium*.

Обнаружение *M. genitalium*

По итогам тестирования не все образцы, идентифицированные в локальных лабораториях как положительные, подтвердили свой статус. Согласно алгоритмам интерпретации результатов исследования, таковые признаются недействительными и исключаются из дальнейшего анализа на выявление мутаций. Частота выявления образцов без обнаружения в них ДНК *M. genitalium* была значительно ниже для ПЦР-DPO и составила 3% (1/33) по сравнению с таковой с использованием ПЦР-FRET – 21% (7/33) (табл. 2).



Таблица 2
Результаты обнаружения ДНК *M. genitalium* и мутаций в гене 23S рРНК
Table 2
Results of detection of *M. genitalium* DNA and mutations in the 23S rRNA gene

Тест-системы	Результат обнаружения	<i>M. genitalium</i>	Результат обнаружения мутации 23S рРНК <i>M. genitalium</i>
ПЦР-DPO	Обнаружено	32	7
	Не обнаружено	1	1
	Всего	33	8
ПЦР-FRET	Обнаружено	26	8
	Не обнаружено	7	0
	Всего	33	8

Соотношение между положительными результатами ДНК *M. genitalium* и истинно положительными результатами позволило определить диагностическую чувствительность теста, реализуемого с использованием методов ПЦР-анализа относительно целевой мишени – *M. genitalium*: диагностическая чувствительность тестов, достигаемая применением ПЦР-DPO и ПЦР-FRET в реальном времени, составила 96,9% и 78,7% соответственно (табл. 2).

Поскольку в сравнении с другими возбудителями ИППП бактериальная нагрузка *M. genitalium* на организм пациента низкая, особенно важна достаточная чувствительность используемых тестов [14].

Анализ влияния видов биологического образца на обнаружение *M. genitalium* различий не выявил: в 57% (4/7) микоплазма была обнаружена в соскобах цервикального канала женщин и в 43% (3/7) – в мазках урогенитального тракта мужчин. Дополнительный анализ исключенных из исследования образцов с применением тест-системы «ПЛАЗМОГЕН-*Mg. Mycoplasma genitalium*» («ДНК-технология», Россия) с пределом обнаружения в 5 копий ДНК *M. genitalium* на амплификационную пробирку (в эквиваленте 50–300 копий/образец) подтвердил наличие нуклеиновой кислоты возбудителя. Следует подчеркнуть, что предел обнаружения целевой мишени может варьировать в зависимости от используемого набора реагентов для выделения ДНК и конечного объема элюции (разведения). Таким образом, при сопоставлении аналитических показателей предела обнаружения для ДНК *M. genitalium*, устанавливаемых применением двух методов выявления резистентности (см. табл. 1), становится очевидным преимущество ПЦР-DPO.

Следует также отметить важность учета ряда преаналитических факторов. Первоначальная низкая бактериальная обсемененность *M. genitalium* в биологическом образце, а также риск деградации ДНК возбудителя при повторном замораживании и оттаивании могут повлиять на качество выявления целевой мишени возбудителя.

Резюмируя изложенное, хотелось бы подчеркнуть, что для успешного тестирования образцов на предмет выявления генетических маркеров антибиотикорезистентности немаловажными факторами являются качество выделенных биологических образцов и соблюдение правил преаналитики.

Обнаружение маркеров устойчивости к макролидам у *M. genitalium*

Результаты анализа положительных образцов ДНК *M. genitalium* после исключения невалидных результатов по каждому методу представлены в табл. 3.

Таблица 3
Результаты обнаружения маркеров устойчивости к макролидам у *M. genitalium* (нумерация по *E. coli*)

Table 3
Results of detection of macrolide resistance markers in *M. genitalium* (numbering by *E. coli*)

Показатели	ПЦР-DPO	ПЦР-FRET	
Спектр выявленных мутаций 23S рПНК <i>M. genitalium</i>	A2058G	4	4
	A2058C	0	0
	A2058T	0	0
	A2059G	3	4
	A2059C	0	0
	A2059T	0	0
	A2611G	–	0
	A2611C	–	0
	A2611T	–	0
Всего	7	8	

ПЦР-FRET-разработка НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России (Смоленск) для выявления маркеров резистентности к макролидам

В ходе анализа результатов (n=26) на наличие маркеров резистентности к макролидам были выявлены мутации в 31% (8/26) образцов, в 69% (18/26) образцов мутации не были обнаружены – wild type. Анализ характера нуклеотидных замен в образцах с выявленными мутациями (n=8) определил мутационный профиль, который представлен в равной степени двумя вариантами нуклеотидных замен в гене 23S рПНК *M. genitalium*: в позициях A2059G 15,5% (4/26) и A2058G 15,5% (4/26). Нуклеотидные замены в позиции 2611 не были выявлены (см. табл. 3).

Все установленные в ходе ПЦР-анализа варианты нуклеотидных замен в образцах ДНК *M. genitalium* были подтверждены методом секвенирования по Сэнгеру соответствующих фрагментов гена по технологии, описанной ранее [12].

Тестирование (n=32) образцов с использованием технологии ПЦР-DPO (Allplex MG & AziR Assay (Seegene))

Данное тестирование позволило получить следующие результаты: в 21,87% (7/32) образцов выявлены мутации, у оставшихся 78,13% (26/32) образцов мутации не были обнаружены – wild type.

Изучение характера нуклеотидных замен в семи образцах определило мутационный профиль, который также представлен двумя вариантами нуклеотидных замен в гене 23S рПНК *M. genitalium*: в позициях A2059G – 9,38% (3/32) и A2058G – 12,5% (4/32) (см. табл. 3).

Важно отметить, что в семи из восьми исследованных образцов с выявленными мутациями результаты, полученные двумя примененными методами, совпадают (см. табл. 3). Наблюдается расхождение по одному варианту нуклеотидной замены в гене 23S рПНК в позиции A2059G. На базе НИИ антимикробной химиотерапии данный образец был идентифицирован как положительный и подтвержден методом секвенирования по Сэнгеру. В свою очередь, по итогам тестирования с использованием



технологии ПЦР-DPO результат исследования был интерпретирован как дикий фенотип – без мутаций. Согласно критериям производителя Seegene, данный образец был признан отрицательным: обнаружение ДНК *M. genitalium* при отсутствии детекции сигнала по каналам, определяющим мутации в гене 23S рРНК.

Учитывая тот факт, что все выявленные на базе НИИ антимикробной химиотерапии мутации были подтверждены методом секвенирования по Сэнгеру (который является «золотым стандартом» для подтверждения последовательностей ДНК), можно предположить, что в результате тестирования при помощи технологии ПЦР-DPO было пропущено 12,5% (1/8) образцов, содержащих маркеры резистентности к макролидам. Такой результат (12,5% (1/8)) демонстрирует риск неэффективности лечения при назначении азитромицина, что вызывает беспокойство.

Следует иметь в виду, что образцы с низкой бактериальной нагрузкой могут быть ошибочно классифицированы как чувствительные к макролидам (дикий тип), поскольку выявление генетических маркеров резистентности к данной группе антибактериальных препаратов менее чувствительно, чем обнаружение *M. genitalium* [15, 16].

Общие характеристики обоих методов мультиплексного ПЦР-анализа принципиальных различий не имеют и демонстрируют доступность применения в рутинной практике лаборатории.

Входной объем образца биологического материала для выделения ДНК *M. genitalium* варьирует от 100 мкл. В данном случае такой объем не будет являться ограничивающим фактором для соскобов и мазков урогенитального тракта, что позволит проводить повторное выделение в случае получения невалидных результатов либо использовать для других молекулярных диагностических тестов. Алгоритмы приготовления смесей и постановка ПЦР-реакции не сложны. Объем полученного препарата ДНК для анализа составляет 5 мкл, что также позволяет использовать оставшийся объем для постановки иных диагностических тестов, например для обнаружения мутаций, связанных с резистентностью к фторхинолонам.

■ ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Широкое внедрение в лабораторную практику технологий выявления генетических маркеров резистентности к макролидам в положительных образцах ДНК *M. genitalium* на базе крупных централизованных лабораторий с последующим анализом полученных данных является весьма актуальным, составляя основную базу изучения эпидемиологии резистентности.

Осуществленный анализ эффективности проводимой антибактериальной терапии у пациентов в соответствии с выявленным статусом антибиотикорезистентности возбудителя может служить основанием для внесения изменений в алгоритм терапии и диагностики данной нозологической формы заболевания.

Предложенный алгоритм лабораторного исследования позволит повысить эффективность лечения благодаря достигаемому с его использованием рациональному назначению антибиотикотерапии и проведению элиминации возбудителя.

■ ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

1. Khatib N., Bradbury C., Chalker V., et al. Prevalence of *Trichomonas vaginalis*, *Mycoplasma genitalium* and *Ureaplasma urealyticum* in men with urethritis attending an urban sexual health clinic. *Int J STD AIDS*. 2015;26(6):388–392. DOI: 10.1177/0956462414539464
2. Jensen J.S., et al. 2021 European guideline on the management of *Mycoplasma genitalium* infections. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2022 May;36(5):641–650. DOI: 10.1111/jdv.17972
3. Clinical protocol for diagnosis and treatment of patients with sexually transmitted infections (approved by the order of the Ministry of Health of the Republic of Belarus dated 10.29.2009 No. 1020). Available at: <https://minzdrav.gov.by/ru/dlya-spetsialistov/standarty-obsledovaniya-i-lecheniya/dermatovenerologiya.php> (accessed November 14, 2024) (In Russ.)
4. Clinical protocol "Medical observation and provision of medical care to women in obstetrics and gynecology" (approved by the Resolution of the Ministry of Health of the Republic of Belarus dated 19.02.2018 No. 17). Available at: <https://minzdrav.gov.by/ru/dlya-spetsialistov/standarty-obsledovaniya-i-lecheniya/akusherstvo-ginekologiya.php> (accessed November 14, 2024) (In Russ.)
5. Clinical protocol for diagnostics and treatment of patients (adult population) with urological diseases when providing medical care in outpatient and inpatient settings of district, regional and republican healthcare organizations of the Republic of Belarus (approved by order of the Ministry of Health of the Republic of Belarus dated 22.09.2011 No. 920). Available at: <https://minzdrav.gov.by/ru/dlya-spetsialistov/standarty-obsledovaniya-i-lecheniya/urologiya.php> (accessed November 14, 2024) (In Russ.)
6. Unemo M., Shipitsyna E., Savicheva A., et al. Guidelines for the laboratory diagnosis of *Mycoplasma genitalium* infections in east European countries. *Acta Derm Venereol*. 2010;90(5):461467. DOI: 10.2340/00015555-0929
7. Workowski K.A., Bachmann L.H., Chan P.A., et al. Sexually Transmitted Infections Treatment Guidelines, 2021. *MMWR Recomm Reports*. 2021;70(4):1–187. DOI: 10.15585/mmwr.r7004a1
8. Machalek D.A., Tao Y., Shilling H., et al. Prevalence of mutations associated with resistance to macrolides and fluoroquinolones in *Mycoplasma genitalium*: a systematic review and metaanalysis. *Lancet Infect Dis*. 2020;20(11):1302–1314. DOI: 10.1016/S1473-3099(20)30154-7
9. Shimanskaya I.G., Kostyuk S.A., et al. (2013) *Diagnosis and treatment of infections of the urogenital tract caused by Mycoplasma genitalium, taking into account the molecular and biological characteristics of the pathogen: an educational and methodical manual*. Minsk: BelMAPO. (In Russ.)
10. Global Health Sector Strategies on, respectively, HIV, viral hepatitis and sexually transmitted infections for the period 2022–2030 (GHSS) July, 2022. Available at: <https://www.who.int/ru/publications/i/item/9789240053779>
11. Kostyuk S.A., Rudenkova T.V., Badigina N.A., et al. Detecting of genetic markers of resistance to antibacterial medicines in *Mycoplasma genitalium* clinical isolates. *Medical Journal*. 2013;(4):76–79. (In Russ.)
12. Eidel'shtein I.A., Romanov A.V., Kozlov S.S. Development of a real-time PCR assay for detection of macrolide resistance mutation in *Mycoplasma genitalium* and its application for epidemiological surveillance in Russia. *Microbial Drug Resistance*. 2023;29(3):69–77. DOI: 10.1089/mdr.2022.0131
13. Young-Jo Lee, Daeyoung Kim, Kihoon Lee, et al. Single-channel multiplexing without melting curve analysis in real-time PCR. *Scientific Reports*. 2014;4:7439. DOI: 10.1038/srep07439
14. Salado-Rasmussen K., Tolstrup J., Sedeh F.B., et al. Clinical importance of superior sensitivity of the Aptima TMA-based assays for *Mycoplasma genitalium* detection. *J Clin Microbiol*. 2022;60(4):e0236921.
15. Durukan D., Doyle M., Murray G., et al. Doxycycline and sitafloxacin combination therapy for treating highly resistant *Mycoplasma genitalium*. *Emerg Infect Dis*. 2020;26(8):1870–4.
16. Read T.R.H., Fairley C.K., Murray G.L., et al. Outcomes of resistance-guided sequential treatment of *Mycoplasma genitalium* infections: a prospective evaluation. *Clin Infect Dis*. 2019;68(4):554–60.