

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 группы 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 А→G; в 2,94% (n=1) случаев – А→С; в 2,94% (n=1) случаев – А→Т. В позиции 2058 было обнаружено 5,88% (n=2) случаев замен А→G. В 2,94% (n=1) случаев было обнаружено одновременно 2 нуклеотидные замены в одном образце в позициях 2058 А→G и 2038 С→Т.

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 С→А. 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 (С→А) 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.