

международных методов и интерпретационных стандартов [4] не проводились. Отсутствуют также данные оценки распространенности мутаций устойчивости к макролидам среди клинических изолятов *M. pneumoniae*, что в значительной степени связано с недостатком коммерческих молекулярно-диагностических систем для выявления значимых мутаций, а также с трудоемкостью классических методов амплификации и секвенирования генов 23S рРНК [5].

В последние годы интенсивно разрабатываются молекулярно-генетические методы для выявления молекулярных основ развития резистентности у микроорганизмов [12]. Эти методы, основанные на выявлении специфических последовательностей ДНК возбудителя, имеют ряд преимуществ перед классической культуральной и иммунологической диагностикой. Обладая высокой чувствительностью и специфичностью, они позволяют добиться большей скорости и производительности исследования при отсутствии необходимости сохранения жизнеспособных клеток возбудителя в изучаемом материале, а исследование возможности формирования устойчивости возбудителя к антимикробным препаратам исключает этап длительного культивирования микроорганизма на искусственных питательных средах.

Для выявления мутаций, приводящих к устойчивости *M. pneumoniae* к макролидным антибиотикам, разработан метод на основе полимеразной цепной реакции (ПЦР) в режиме реального времени, который может быть использован как скрининговый подход для мониторинга возможных механизмов резистентности.

Материал и методы. В исследование были включены 146 клинических образцов: 111 соскобов с задней стенки глотки и 35 проб мокроты, полученных в 2006–2013 гг. от пациентов с инфекциями нижних дыхательных путей (бронхит, пневмония). Материал поступил из лаборатории микоплазм и L-форм бактерий НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, лаборатории референс-центра по мониторингу за возбудителями инфекций верхних и нижних дыхательных путей ЦНИИЭ Роспотребнадзора и лаборатории молекулярной диагностики НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской

государственной медицинской академии. 36 из 146 образцов были получены от пациентов во время вспышки микоплазменной пневмонии на территории Смоленской области в 2013 г. [1]. В лабораториях-участниках проекта был осуществлен первичный скрининг клинического материала на наличие ДНК *M. pneumoniae* с применением коммерческого набора реагентов «АмплиСенс *Mycoplasma pneumoniae/Chlamydophila pneumoniae*-FL» (ЦНИИЭ, Россия) на основе технологии ПЦР в режиме реального времени. Выделение ДНК проводили с помощью набора «Рибо-Преп» (ЦНИИЭ, Россия). В качестве контролей использовали образцы ДНК контрольного штамма *M. pneumoniae* FH ATCC15531 (последовательность гена 23S рРНК дикого типа), *M. pneumoniae* P05/132 (23S рДНК A2064G), *M. pneumoniae* T79 (23S рДНК A2063G), *M. pneumoniae* B 6329 (23S рДНК C2617G) [4, 12, 14].

Наличие мутаций в гене 23S рРНК определяли методом ПЦР в реальном времени с эффектом гашения флуоресценции зонда праймером. Разработанный метод (табл.) обеспечивал возможность выявления любых нуклеотидных замен в позициях 2063, 2064 и 2617 в гене 23S рРНК *M. pneumoniae* (2057, 2058 и 2611 согласно нумерации для *Escherichia coli*) с помощью анализа кривых плавления зондов непосредственно после проведения амплификации в мультиплексном формате (табл.). Дизайн праймеров и зондов осуществляли с помощью программного пакета CLC Main Workbench v. 5.7.1 (CLC Bio, Qiagen, Дания) с использованием встроенных алгоритмов BLAST и Primer-BLAST для проверки специфичности праймеров (www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/). Расчет теоретической температуры плавления зондов для полностью комплементарных последовательностей 23S рДНК и ее изменения при наличии замен A2063G/T, A2064G/C и C2617G проводили с помощью программы MeltCalc (www.meltcalc.com).

Состав смеси для мультиплексной ПЦР общим объемом 25 мкл включал: олигонуклеотидные праймеры и зонды (ЗАО «Синтол», Россия) в концентрации, указанной в табл.: 0,2 мМ дНТФ, 2 мМ MgCl₂, 2,5 ед. ДНК полимеразы SNP Detect, 1х ПЦР буфер SNP Detect (Evrogen, Россия) и 3 мкл образца ДНК.

Таблица

Олигонуклеотидные праймеры и зонды для выявления и характеристики мутаций в 23S рРНК.

Праймер/зонд	Последовательность, 3' -5'*	Концентрация в ПЦР, мкМ
Mpn2617-Rv	AAGCAACACTCTTCAATCTTCC(T-BHQ1)A AC	0,2
Mpn2617-Fw	CGTCGTGAGACAGGTGG	0,8
Mpn2617-Pb	GGTTGGTCCCTATCTATTGTG-(R6G)	0,2
Mpn2063-Rv2	TGTCCTGATCAATATTAATCTACAG(T-BHQ1)AAAG	0,2
Mpn2063-Fw2	GAAGACACCCGTTAGGCGCAAC CAACGGGAC	0,8
Mpn2063-Pb2	GGAAAGACC-(FAM)	0,2

* FAM – карбоксифлуоресцеин, R6G – 6-карбоксиродамин, BHQ1(black hole quencher 1) – темновой гаситель флуоресценции-1.

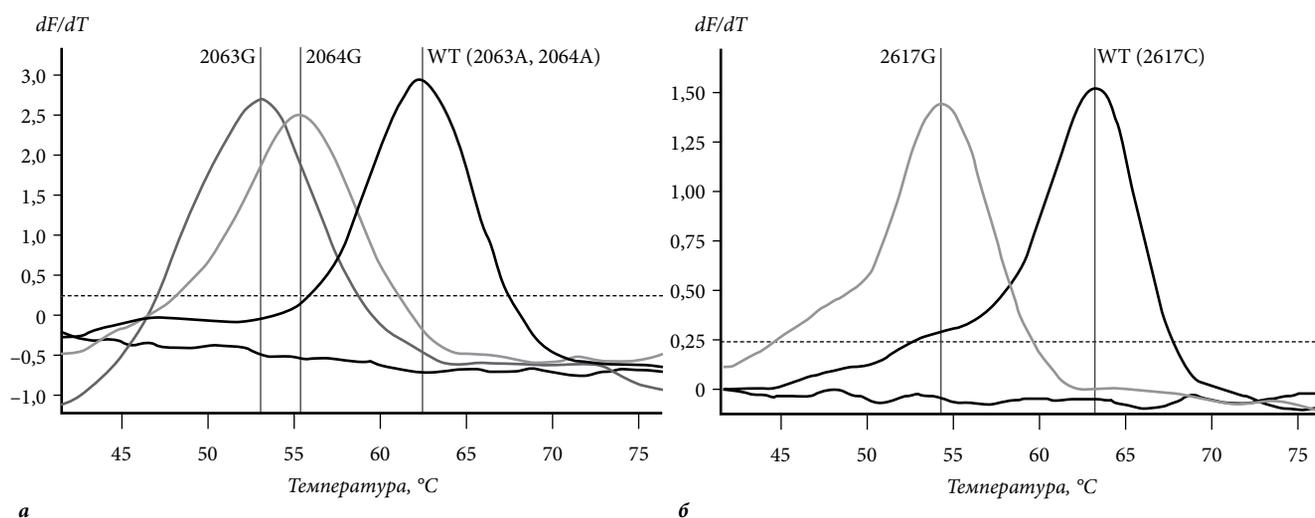


Рис. Пример одновременного выявления различных мутаций устойчивости к макролидам в гене 23S рРНК *M. pneumoniae* с помощью оценки кривых плавления флуоресцентно меченых зондов (а – FAM, б – R6G) после мультиплексной ПЦР в режиме реального времени. WT – wild type (дикий тип).

Аmplification and analysis of melting curves of probes were performed using the Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Australia) according to the following protocol: initial incubation 15 min. at 95 °C; then 55 cycles of 20 s denaturation at 95 °C and 15 s extension-elongation at 55 °C with detection of fluorescence on FAM and JOE (R6G) channels; analysis of melting curves with initial incubation 2 min. at 45 °C and subsequent temperature increase by 1 °C every 10 s up to 85 °C with detection of fluorescence on FAM and JOE (R6G) channels. Identification of sequences «wild type» and mutations in 23S rRNA were performed in accordance with the melting temperature of probes.

Результаты исследования. Используемая в данном исследовании технология ПЦР обеспечивает возможность выявления различных (как известных, так и неизвестных) мутаций в области связывания олигонуклеотидных зондов и основана на эффекте переноса энергии флуоресценции между зондом и одним из праймеров [2]. Для детекции мутаций в двух целевых участках гена 23S рРНК *M. pneumoniae*, включающих позиции 2063–2064 и 2617, разработаны, соответственно, два олигонуклеотидных зонда, содержащих флуорофоры (FAM и R6G) на 3'-конце и полностью комплементарные последовательностям 23S рДНК дикого типа, и две пары праймеров, в каждой из которых один праймер, формирующий цепь ДНК, комплементарную зонду, расположен непосредственно перед областью связывания зонда и содержит внутренний нефлуоресцирующий (темновой) гаситель флуоресценции. Таким образом, связывание зондов с цепями ДНК, образованными в результате элонгации праймеров, приводит к сближению флуорофоров и гасителей на расстояние, достаточное для эффективного гашения флуоресценции за счет резонансного переноса энергии флуоресценции или образования стабильных комплексов между флуорофором и гасителем (статическое или контактное

гашение). В соответствии с описанным выше дизайном, мутации в участках 23S рРНК могут быть выявлены с помощью постамплификационного анализа кривых плавления зондов: образцы, содержащие однонуклеотидные замены в области связывания зонда, характеризуются сниженной аффинностью и, соответственно, меньшей температурой плавления. Контрольные образцы ДНК *M. pneumoniae*, несущие мутации A2063G и A2064G были четко различимы между собой и отличались от образцов «дикого типа» по температуре плавления зонда Mrp2063-Pb2, соответственно на 9,5 и 7,3 °C (рис., а). Разница в температуре плавления зонда Mrp2617-Pb для мутантного образца C2617G по сравнению с образцом дикого типа составила 8,8 °C (рис., б).

Специфичность разработанного метода были оценены путем исследования контрольных образцов, содержащих ДНК *Chlamydomphila pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, а также 20 образцов ДНК человека, не содержащих ДНК *M. pneumoniae*. Все образцы, выбранные для контроля специфичности, были предварительно охарактеризованы с использованием коммерческих наборов реагентов ЦНИИЭ (Россия). Положительные результаты амплификации получены только для образцов ДНК *M. pneumoniae* (специфичность 100%). Аналитическая чувствительность метода составила не менее 15 геномэквивалентов *M. pneumoniae* FH ATCC 15531 на реакцию.

Разработанный метод был использован для анализа 146 клинических образцов, положительных на наличие ДНК *M. pneumoniae* по результатам первичного скрининга с использованием коммерческого набора реагентов «АмплиСенс *Mycoplasma pneumoniae/Chlamydomphila pneumoniae*-FL». Специфические последовательности 23S рРНК были обнаружены в 140 образцах (относительная чувствительность 95,8%). Скрининг не выявил

мутаций, ассоциированных с устойчивостью к макролидам, ни в одном случае. Все образцы имели профиль плавления зондов Mrp2063-Pb2 и Mrp2617-Pb, идентичный «дикому типу».

Обсуждение полученных данных. Таким образом, разработан быстрый и чувствительный метод определения мутаций устойчивости к макролидам в гене 23S рРНК *M. pneumoniae*. По сравнению с описанными в литературе молекулярно-генетическими методами, такими как классическое секвенирование по Сэнгеру [5], пиросеквенирование [13] или анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов [10], он обладает классическими преимуществами, характерными для ПЦР в режиме реального времени: является одноэтапным и не требует манипуляций с продуктами амплификации, что упрощает анализ и снижает риск контаминации. Так же, как и метод FRET ПЦР в режиме реального времени, описанный О. Peuchant et al. [12], предложенный нами подход обеспечивает возможность одновременного выявления различных мутаций в позициях 2063, 2064 и 2617 гена 23S рРНК и, кроме того, дополнительно позволяет дифференцировать замены A2063G и A2064G.

В ходе молекулярно-генетического скрининга коллекции респираторных образцов, содержащих ДНК *M. pneumoniae*, не были выявлены значимые мутации, связанные со снижением чувствительности к макролидным препаратам. Разработанный подход может быть использован для быстрого выявления мутаций и прогнозирования возможной устойчивости *M. pneumoniae* к макролидным антибиотикам.

Литература

1. Бобылев А.А., Рачина С.А., Эйдельштейн И.А. [и др.] Описание вспышки инфекции, вызванной *Mycoplasma pneumoniae*, в Смоленской области // Пульмонология. 2013. Т. 5. С. 97–100.
2. Эйдельштейн И.И., Эйдельштейн М.В., Романов А.В. [и др.] Оценка распространенности «классических» механизмов устойчивости к фторхинолонам у *Chlamydia trachomatis*, связанных с мутациями в генах топоизомераз // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014. Т. 16, № 4. С. 301–307.
3. Averbuch D., Hidalgo-Grass C., Moses A. [et al.] Macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae*, Israel, 2010 // Emerging Infectious Diseases (Centers for Disease Control and Prevention). 2011. Vol. 17, No. 6. P. 1079–1082.
4. Clinical and Laboratory Standards Institute. 2011. Methods for antimicrobial susceptibility testing of human mycoplasmas. Approved Guideline M43-A. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA.
5. Dumke R., von Baum H., Lück P. [et al.] Occurrence of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains in Germany // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 2010. Vol. 16, No. 6. P. 613–616.
6. Dumke R., Stolz S., Jacobs E. [et al.] Molecular characterization of macrolide resistance of a *Mycoplasma pneumoniae* strain that developed during therapy of a patient with pneumonia // Int. J. Infect. Dis. 2014. Vol. 29. P. 197–199.
7. Godron A., Pereyre S., Monet C. [et al.] Hemolytic uremic syndrome complicating *Mycoplasma pneumoniae* infection // Pediatr. Nephrol. 2013. Vol. 28, No. 10. P. 2057–2060.
8. Hantz S., Garnier F., Peuchant O. [et al.] Multilocus variable-number tandem-repeat analysis-confirmed emergence of a macrolide resistance-associated mutation in *Mycoplasma pneumoniae*

- during macrolide therapy for interstitial pneumonia in an immunocompromised child // Journal of Clinical Microbiology. 2012. Vol. 50, No. 10. P. 3402–3405.
9. Li X., Atkinson T., Hagood J. [et al.] Emerging macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* in children: detection and characterization of resistant isolates // Pediatric Infectious Disease Journal. 2009. Vol. 28, No. 8. P. 693–696.
 10. Mayumi M., Mitsuo N., Norio O. [et al.] Characterization and molecular analysis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* clinical isolates obtained in Japan // Antimicrob. Agents Chemother. 2004. Vol. 48, No. 12. P. 4624–4630.
 11. Mulholland S., Gavranich J., Gillies M., Chang A.B. Antibiotics for community-acquired lower respiratory tract infections secondary to *Mycoplasma pneumoniae* in children // Cochrane Database Syst. Rev. 2012. Vol. 12, No. 9. DOI: 10.1002/14651858.CD004875.pub4.
 12. Peuchant O., Ménard A., Renaudin H. [et al.] Increased macrolide resistance of *Mycoplasma pneumoniae* in France directly detected in clinical specimens by real-time PCR and melting curve analysis // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2009. Vol. 64, No. 1. P. 52–58.
 13. Spuesens E., Hoogenboezem T., Sluijter M. [et al.] Macrolide resistance determination and molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* by pyrosequencing // J. Microbiol. Methods. 2010. Vol. 82, No. 3. P. 214–222.
 14. Spuesens E., Meijer A., Bierschen D. [et al.] Macrolide resistance determination and molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory specimens collected between 1997 and 2008 in The Netherlands // Journal of Clinical Microbiology. 2012. Vol. 50, No. 6. P. 1999–2004.
 15. Waites K., Talkington D. *Mycoplasma pneumoniae* and its role as a human pathogen // Clin. Microbiol. Rev. 2004. Vol. 17, No. 4. P. 697–728.

Поступила в редакцию 13.01.2015.

Выявление мутаций устойчивости к макролидам в гене 23S рРНК *Mycoplasma pneumoniae* с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени

И.А. Эйдельштейн¹, М.В. Эйдельштейн¹, А.В. Романов¹, С.А. Рачина¹, С.Б. Яцышина², И.В. Раковская³, Р.С. Козлов¹

¹ Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии (214019, г. Смоленск, ул. Кирова, 46а), ²Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии (111123, г. Москва, ул. Новогиреевская, 3а), ³Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени Н.Ф. Гамалеи РАМН (123098, г. Москва, ул. Гамалеи, 18)

Резюме. В последнее время данные зарубежных публикаций свидетельствуют о появлении и распространении устойчивости *Mycoplasma pneumoniae* к макролидным антибиотикам, которая связана с мутациями в гене 23S рРНК, главным образом, в позициях 2063, 2064 и 2617. Выявление соответствующих однонуклеотидных замен позволяет эффективно предсказать фенотип устойчивости к макролидам, однако, используемые с этой целью методы являются трудоемкими и дорогостоящими. Исследование посвящено разработке и валидации нового метода определения мутаций, ассоциированных с устойчивостью к макролидам у *M. pneumoniae*, а также его использованию для анализа клинических образцов. Показана возможность выявления и дифференциации различных мутаций в позициях 2063, 2064 и 2617 гена 23S рРНК в формате однопробирочной мультиплексной полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с последующим анализом кривых плавления флуоресцентно-меченых зондов. При исследовании клинических образцов во всех случаях обнаружены последовательности 23S рДНК *M. pneumoniae* «дикого типа», характерные для фенотипа чувствительности к макролидам.

Ключевые слова: микоплазмы, молекулярная диагностика, антибиотикорезистентность.