

Четыре случая выявления мутаций устойчивости в гене 23S рРНК *Mycoplasma pneumoniae*, выделенных от военнослужащих с пневмонией, находящихся на лечении в военном госпитале

Эйдельштейн И.А.¹, Эйдельштейн М.В.¹, Романов А.В.¹, Зайцев А.А.², Раковская И.В.³, Бархатова О.И.³ Антипушина Д.Н.², Козлов Р.С.¹

¹ НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России, Смоленск, Россия

² ФГКУ «Главный военный клинический госпиталь им. акад. Н.Н. Бурденко», Москва, Россия

³ ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия

Контактный адрес:

Инна Александровна Эйдельштейн
Эл. почта: Inna.Edelstein@antibiotic.ru

Ключевые слова: *Mycoplasma pneumoniae*, макролиды, резистентность, 23S рРНК, мутации.

Mycoplasma pneumoniae – возбудитель заболеваний верхних и нижних дыхательных путей, передается воздушно-капельным путем, вызывая вспышки пневмонии преимущественно в закрытых коллективах. Лечение заболеваний, вызванных *M. pneumoniae*, в соответствии с рекомендациями должно проводиться антимикробными препаратами группы макролидов. Однако в последнее время данные зарубежных публикаций свидетельствуют о появлении и распространении устойчивости *M. pneumoniae* к макролидным антибиотикам, которая связана с мутациями в гене 23S рРНК, главным образом, в позициях 2063, 2064 и 2617 (нумерация по *M. pneumoniae*). Выявление соответствующих однонуклеотидных замен позволяет эффективно предсказать фенотип устойчивости к макролидам, однако используемые с этой целью методы являются трудоемкими и дорогостоящими. Настоящее 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, полученных от 31 пациента с пневмонией, находящихся на лечении в военном госпитале. При исследовании клинических образцов у четырех пациентов обнаружены характерные для фенотипа резистентности последовательности 23S рРНК *M. pneumoniae*. Макролидрезистентный генотип A2063G был выявлен у двух *M. pneumoniae*-положительных военнослужащих. Нуклеотидная замена в позиции A2064G была идентифицирована у одного пациента. Редкий вариант мутации в гене 23S рРНК *M. pneumoniae*, соответствующий генотипу C2617G, обнаружили у одного пациента. В одном случае была выявлена смешанная популяция клеток «дикого» типа и «мутантного» варианта *M. pneumoniae*. Разработанный молекулярно-генетический подход обладает хорошей дискриминирующей возможностью для выявления и дифференциации «диких» и резистентных генотипов *M. pneumoniae* непосредственно в клиническом материале, может быть использован для быстрого выявления мутаций и прогнозирования возможной устойчивости респираторных микоплазм к макролидным антибиотикам, а также являться дополнительным инструментом в тактике подбора адекватной терапии.

Four cases of resistance mutations in 23S rRNA gene in *Mycoplasma pneumoniae* isolated from the hospitalized military personnel

Edelstein I.A.¹, Edelstein M.V.¹, Romanov A.V.¹, Zaitsev A.A.², Rakovskaya I.V.³, Barkhatova O.I.³, Antipushina D.N.², Kozlov R.S.¹

¹ Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk, Russia

² Main Military Clinical Hospital named after N.N. Burdenko, Moscow, Russia

³ National Research Center of Epidemiology and Microbiology named after N.F. Gamaleya, Moscow, Russia

Contacts:

Inna A. Edelstein
E-mail: Inna.Edelstein@antibiotic.ru

Key words: *Mycoplasma pneumoniae*, macrolides, resistance, 23S rRNA, mutations.

Mycoplasma pneumoniae is a bacterial pathogen cause of upper and lower respiratory tract infections, transmitted by airborne droplets, causing outbreaks of pneumonia mainly in closed groups. According with recommendations, *M. pneumoniae* infections can usually be effectively treated with macrolides, which are generally considered the first-choice antibiotics in young adults. However, macrolide resistance has been observed in a number of countries. Macrolide resistance phenotypes are defined by specific point mutations in the V domain of the single-copy 23S rRNA gene of *M. pneumoniae*, mainly at positions 2063, 2064 and 2617 (numbering according to *M. pneumoniae*). Identification of appropriate single nucleotide substitutions allows effectively predicting the phenotype of resistance to macrolides, but the methods used for this purpose currently are laborious and costly. The present study is devoted to the development and validation of a new method for the determination of mutations associated with macrolide resistance in *M. pneumoniae*, as well as its use for the analysis of clinical specimens obtained from 31 patients with pneumonia treated in a military hospital. Two and one patients had *M. pneumoniae* isolates with a substitution at positions 2063 and 2064, respectively. In one case, a mixed population of wild-type and mutated *M. pneumoniae* isolate was observed. A rare mutation variant in the 23S rRNA gene of *M. pneumoniae* corresponding to the genotype C2617G was found in one patient. Our PCR-RT assay is able to discriminate between wild-type and resistant genotypes of *M. pneumoniae* directly from clinical specimens can be used to quickly identify type of mutations and predict possible resistance respiratory mycoplasmas to macrolide antibiotics. This assay will allow clinicians to shorten the time to the initiation of effective disease treatment.

Введение

В Вооруженных силах РФ патологии органов дыхания ежегодно сохраняют ведущие позиции в структуре инфекционных заболеваний и составляют более 80% выявленных случаев [1]. При этом неизменно важной проблемой для военно-медицинской службы является внебольничная пневмония (ВП) в связи с возможностью эпидемического распространения среди личного состава и, прежде всего, среди новобранцев, в осенне-зимний период [2, 3]. В частности, вспышки пневмонии в закрытых коллективах вызывает «атипичный» возбудитель – *Mycoplasma pneumoniae*, который передается воздушно-капельным путем. На долю пневмоний в этиологической структуре приходится около 15-20% случаев [4, 5].

Макролиды в современных клинических рекомендациях позиционируются как препараты с высокой активностью в отношении «атипичных» микроорганизмов и являются антибиотиками выбора для лечения заболеваний, вызванных *M. pneumoniae*. Их безусловным достоинством являются также высокие концентрации в бронхиальном секрете и лёгочной ткани, благоприятный профиль безопасности и отсутствие перекрёстной аллергии с β-лактамами антибиотиками [6]. Однако публикации последних лет свидетельствуют о нарастании вторичной устойчивости к препаратам данной группы у клинических штаммов микоплазм [7]. В отдельных работах описаны случаи рецидива микоплазменной пневмонии или длительного ее течения на фоне терапии макролидными антибиотиками [8], известны также случаи формирования устойчивости к азитромицину в процессе терапии [9]. Более того, в ряде стран Европы, Азии и Северной Америки зарегистрированы локальные вспышки респираторных инфекций, вызванных устойчивыми к макролидам штаммами *M. pneumoniae* [10]. Указанные факты необходимо учитывать при оценке эффективности проводимой терапии и планировании дальнейшей лечебной тактики в случаях затяжного течения ВП.

В настоящее время проблема развития антибиотикорезистентности у микоплазм изучена достаточно хорошо, описаны молекулярные механизмы устойчивости к макролидам у клинических изолятов *M. pneumoniae* [11]. Одним из ведущих механизмов формирования резистентности является наличие мутаций в генах пептидилтрансферазной петли V домена 23S рРНК, приводящее к конформационным изменениям и, соответственно, к снижению аффинности препаратов [12].

В России проблема антибиотикорезистентности *Mycoplasma pneumoniae* не освещена. Ввиду трудоемкости и длительности процесса выделения и культивирования этого патогена, исследования, посвященные изучению чувствительности этого микроорганизма к антимикробным препаратам с использованием международно-принятых методов и интерпретационных стандартов, в настоящий момент не представлены [13].

Отсутствуют также данные оценки распространенности мутаций устойчивости к макролидам среди клинических изолятов *M. pneumoniae*, что в значительной степени связано с отсутствием коммерческих молекулярно-диагностических систем для выявления значимых мутаций, а также с трудоемкостью классических методов амплификации и секвенирования генов 23S рРНК [14].

Для выявления мутаций, приводящих к устойчивости *M. pneumoniae* к макролидным антибиотикам нами был разработан метод на основе ПЦР в режиме реального времени,

который может быть использован как скрининговый подход для мониторинга возможных механизмов резистентности у клинических изолятов к этой группе препаратов. Разработанный подход был применен для анализа клинических образцов, полученных от пациентов с пневмонией.

Материал и методы

Клинические образцы и первичный скрининг

Образцы мокроты (n=18) и соскобы с задней стенки глотки (n=13) были получены от 31 пациента с рентгенологически подтвержденной пневмонией, находящихся на лечении в пульмонологическом отделении военного госпиталя, в период с 2014 по 2016 гг. В лаборатории госпиталя был исследован клинический материал на наличие ДНК *M. pneumoniae* с использованием коммерческого набора реагентов «Ампли-Сенс® *Mycoplasma pneumoniae/Chlamydophila pneumoniae*-FL» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия) на основе технологии ПЦР в режиме реального времени с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Выделение ДНК проводили с использованием набора «Рибо-Преп» (ФБУН ЦНИИЭ, Россия). Аналитическая чувствительность коммерческой тест-системы составляет 500 ГЭ/мл в соответствии с инструкцией производителя. Образцы ДНК положительные на наличие *M. pneumoniae*, анализировались на наличие мутаций в лаборатории молекулярной диагностики НИИ антимикробной химиотерапии СГМУ.

Контрольные образцы

В качестве контролей использовали образцы ДНК контрольного штамма *M. pneumoniae* FH ATCC®15531 (последовательность гена 23S рРНК «дикого» типа), *M. pneumoniae* P05/132 (23S рДНК A2064C), *M. pneumoniae* T79 (23S рДНК A2063G), *M. pneumoniae* B 4010 (23S рДНК A2064G), *M. pneumoniae* B 6329 (23S рДНК C2617G) [13, 16, 17].

Специфичность разработанного метода определялась при исследовании образцов, содержащих ДНК *S. pneumoniae*, *M. pneumoniae* и ДНК других респираторных бактерий, а также 100 образцов ДНК человека, не содержащих ДНК *M. pneumoniae*. Все исследованные образцы, выбранные для контроля специфичности, были предварительно охарактеризованы с использованием коммерческих наборов реагентов ФБУН ЦНИИЭ (Россия).

Мультиплексная ПЦР в режиме реального времени для анализа мутаций в 23S рРНК (P2P)

Наличие мутаций в гене 23S рРНК определяли с использованием модифицированного метода ПЦР-РВ с эффектом гашения флуоресценции зонда праймером [18]. Разработанный метод обеспечивал возможность выявления любых нуклеотидных замен в позициях 2063, 2064 и 2617 в гене 23S рРНК *M. pneumoniae* (2058, 2059 и 2611 согласно нумерации для *E. coli*) с помощью анализа кривых плавления зондов непосредственно после проведения амплификации в мультиплексном формате (таблица 1). 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 (Tm) зондов для полностью комплементарных последовательностей 23S рРНК и изменения Tm (ΔTm) при на-

Таблица 1. Олигонуклеотидные праймеры и зонды для выявления и характеристики мутаций в гене 23S рРНК

Праймер/зонд	Последовательность, 3'-5'*	Концентрация в ПЦР, мкМ
Mrp2617-Rv	AAGCAACACTCTTCAATCTCC(T-BHQ1)A	0,8
Mrp2617-Fw	ACCGTCGTGAGACAGGTTGG	0,2
Mrp2617-Pb	GGTGGTCCCTATCTATTGTG-(R6G)	0,2
Mrp2063-Rv3	ATCAATATTATGCTACAGTAAAGCT(T-BHQ1)CACG	0,8
Mrp2063-Fw2	GAAGACACCCGTTAGGCGCAAC	0,2
Mrp2063-Pb2	CAACGGGACGGAAAGACC-(FAM)	0,2
Mpg23sSeqF	CGTCCCGCTTGAATGGTGAAC	ПЦР и секвенирование 23s рРНК
Mpg23sSeqR	GCGCTACAACCTGGAGCATAAG	

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

личии 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 (синтез ЗАО «Синтол», Россия) в концентрации, указанной в таблице 1, 0,2 мМ дНТФ, 2 мМ MgCl₂, 2,5 ед. ДНК полимеразы SNP Detect, 1x ПЦР буфер SNP Detect (Evrogen, Россия) и 5 мкл образца ДНК.

Аmplification и анализ кривых плавления зондов проводили с помощью системы Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) согласно следующему протоколу: начальная инкубация 5 мин. при 95°C; затем 55 циклов: 20-сек. денатурации при 95°C и 15-сек. отжига-элонгации при 55°C с детекцией флуоресценции на каналах FAM и JOE (R6G); анализ кривых плавления с начальной инкубацией 2 мин. при 45°C и последующим повышением температуры на 1°C каждые 10 сек. до 85°C с детекцией флуоресценции на каналах FAM и JOE (R6G).

Секвенирование гена 23S рРНК *M. pneumoniae*

Идентификацию последовательностей «дикого типа» и мутаций в гене 23S рРНК проводили в соответствии с температурой плавления зондов. При выявлении с помощью ПЦР-РВ отличной от контрольного образца температуры плавления зонда, свидетельствующей о наличии мутаций в гене 23S рРНК, внутренний фрагмент длиной 747 п. н., исследовали путем дополнительной амплификации и секвенирования с внутренними праймерами (таблица 1). Секвенирование проводили с помощью наборов BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и генетического анализатора Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Life Technologies, CA, USA). Для подтверждения характера замены, все образцы ДНК *M. pneumoniae*, несущие мутации были дополнительно исследованы методом секвенирования.

Результаты и обсуждение

Дизайн и валидация ПЦР-РВ для детекции мутаций в гене 23S рРНК *M. pneumoniae*. Используемая в данном исследовании технология ПЦР-РВ 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 [19]. Для детекции мутаций в двух целевых участках гена 23S рРНК *M. pneumoniae*, включающих позиции 2063-2064 и 2617, разработаны два олигонуклеотидных зонда, содержащих флуорофоры (FAM и R6G) на 3'-конце, которые полностью комплементарны последовательностям 23S рРНК 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 (BHQ1). 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 (FRET) 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 постаmplificationного анализа кривых плавления зондов: образцы, содержащие однонуклеотидные замены в области связывания зонда, характеризуются сниженной аффинностью и, соответственно, меньшей температурой плавления (T_m) зонда. В качестве целевого фрагмента для выявления мутаций был выбран специфичный участок, который характеризуется областью с высокой Г-Ц насыщенностью и содержанием вторичных структур, окружающие полиморфизмы. Несмотря на «сложное» генетическое окружение метод позволяет выявлять различные (известные и неизвестные) мутации в заданных локусах. Праймеры и зонды характеризуются высоким уровнем специфичности для *M. pneumoniae*, что было подтверждено отсутствием положительных сигналов в образцах, не содержащих ДНК *M. pneumoniae* и ДНК различных микроорганизмов, как правило, присутствующих в дыхательных путях человека. Положительные результаты амплификации получены только для образцов ДНК *M. pneumoniae* (специфичность 100%).

Пример выявления мутаций с помощью ПЦР-РВ и анализа кривых плавления зондов представлен на рисунке 1. Для всех контрольных и клинических образцов были получены характерные пики плавления, характеризующие фенотип «дикого типа»: T_m=62°C±0,55°C (FAM) и T_m=63°C±0,52°C HEX (R6G).

Контрольные образцы ДНК *M. pneumoniae*, несущие мутации A2063G и A2064G дают одинаковые пики и характеризуются T_m=51°C±0,56°C, но хорошо дифференцируются от образцов «дикого типа» по температуре плавления зонда Mrp2063-Pb2 на 10°C (рисунок 1А). Непосредственная близость расчетных T_m для пиков плавления не позволяет четко дифференцировать характер мутации, что может являться необходимым лишь для проведения эпидемиологических исследований.

Контрольный образец, имеющий замену в позиции A2064C, имеет ΔT_m=3°C, по сравнению с контрольным пиком A2063G/A2064G, и ΔT_m=8°C по сравнению с образцом «дикого типа». Анализ расчетных и экспериментальных T_m показывает, что значимые мутации в позициях A2063G/A2064G и A2064C хорошо дифференцируются при скрининговом анализе, а также визуально отличаются от образцов «дикого типа».

Разница в температуре плавления зонда Mrp2617-Pb для мутантного образца C2617G по сравнению с образцом дикого типа составляет 8,5°C (рисунок 1В).

Следует отметить, что разработанная методика демонстри-

рует несколько сниженную чувствительность по сравнению с используемым коммерческим набором для первичного скрининга. Из 31 положительного образца ДНК *M. pneumoniae* два (6,5%) не удалось проанализировать на наличие мутаций (относительная чувствительность 93,5%). Это может объясняться характером гена-мишени, используемого в двух различных вариантах диагностических подходов. Исследуемый ген 23S рРНК представлен в одной копии в опероне генома *M. pneumoniae*, коммерческая диагностическая система построена на выявлении специфического участка гена *putative lipoprotein*, который присутствует в геноме также в единичной копии, тем не менее, порог детекции разработанной методики ниже заявленного для коммерческой тест-системы.

Скрининг клинических образцов на наличие мутаций устойчивости к макролидам в гене 23S рРНК *M. pneumoniae*

Специфические последовательности 23S рРНК были выявлены в 28 образцах, которые имели профиль плавления Mrp2617-Pb, идентичный «дикому типу» (рисунок 1В). Об-

разец №22 продемонстрировал наличие мутации в позиции 2617 соответствующее замене С→G, что продемонстрировано изменением температуры плавления зонда ($\Delta T_m=11,2^\circ\text{C}$) по сравнению с образцами WT.

Три образца показали характерное снижение температуры плавления зонда ($\Delta T_m=10^\circ\text{C}$), свидетельствующее о наличии мутации в позиции A2063/2064G 23S рРНК (рисунок 1А). Последующий анализ с использованием секвенирования подтвердил наличие однонуклеотидной транзиции, в области связывания зонда в центральной петле домена V, которая соответствует замене A→G в позиции 2063 для двух образцов (№10, 21) и замене A→G в позиции 2064 для другого (№20) (рисунок 2).

Характеристика пациентов с выявленными мутациями в 23S рРНК *M. pneumoniae*, представлена в таблице 2.

Один образец (№11) был представлен смешанной популяцией, состоящей из клеток «дикого» типа и несущих мутацию, результат плавления продуктов, амплификации которого представлен двухпиковым графиком (рисунок 1А). Очевидно,

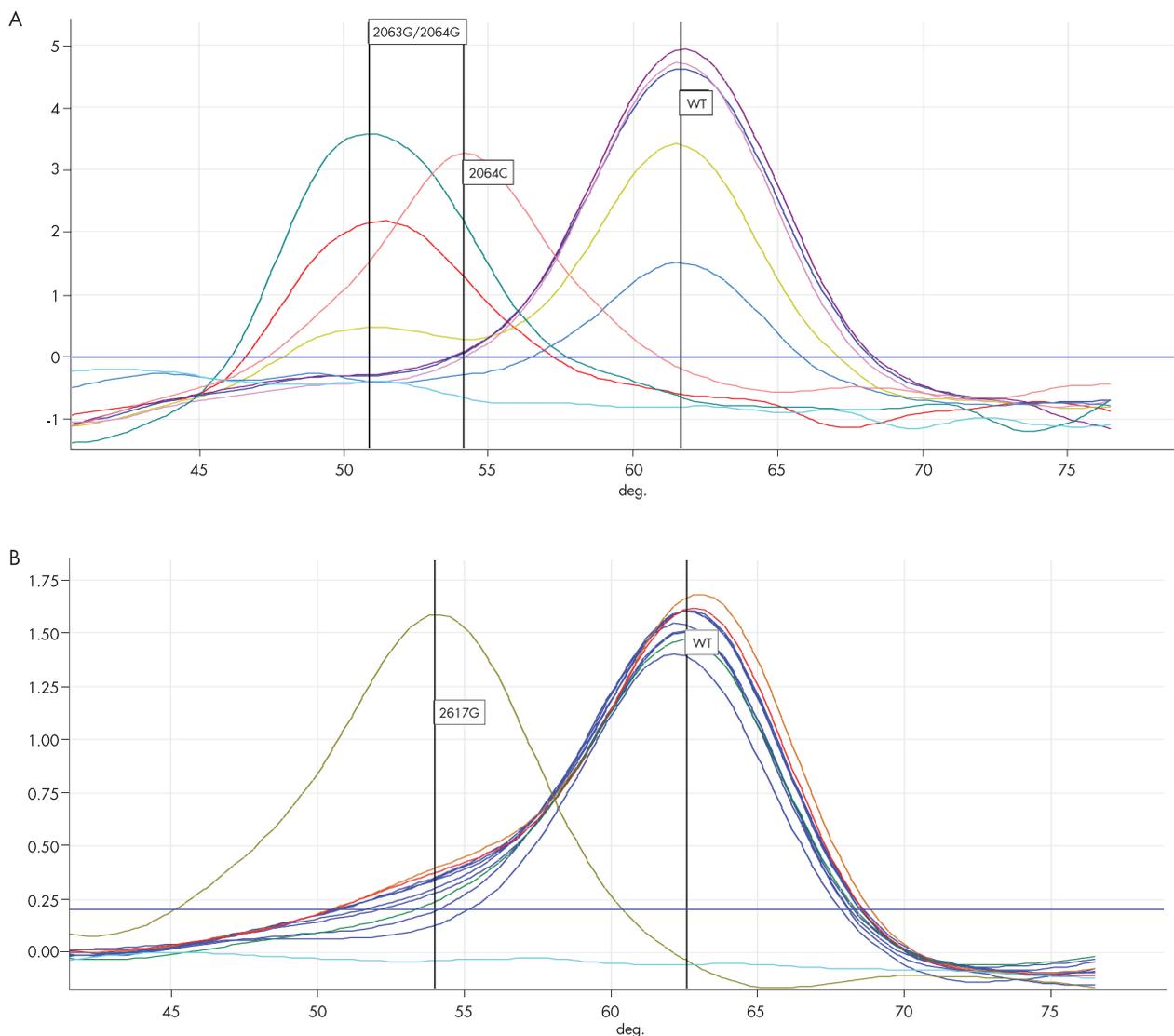


Рисунок 1. Пример одновременного выявления различных мутаций устойчивости к макролидам в гене 23S рРНК *M. pneumoniae* с помощью оценки кривых плавления флуоресцентно меченых зондов (А – FAM, В – HEX(R6G)) после проведения мультиплексной ПЦР-РВ. WT – дикий тип (wild type)

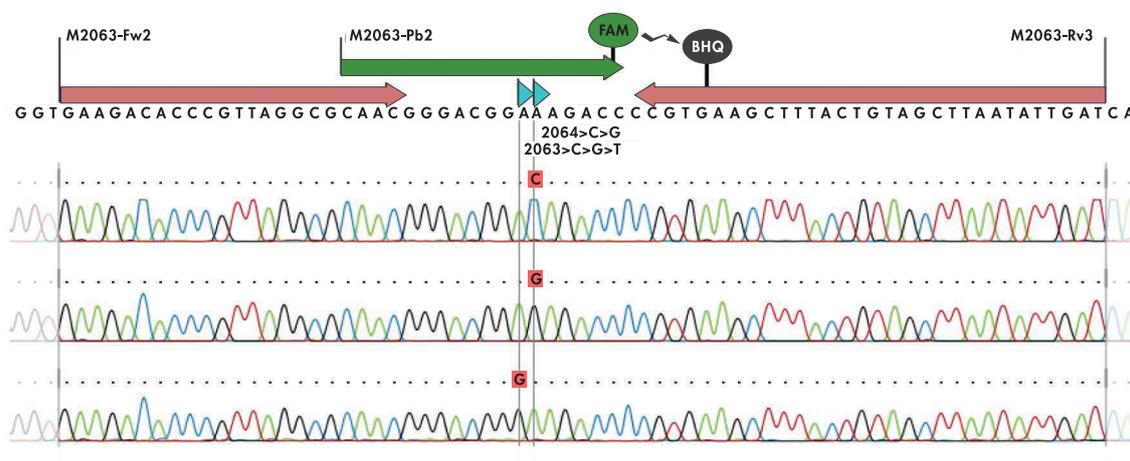


Рисунок 2. Фрагмент нуклеотидной последовательности 23S рРНК *M. pneumoniae* «дикого типа» (сверху) и соответствующей мутантной последовательности (внизу) с указанием позиций замен, а также участков связывания праймеров и зонда, для контрольного штамма *M. pneumoniae* P05/132 (23S рДНК А2064С) и клинических образцов.

в процессе развития популяция клеток дивергирует с различной скоростью. Подобный феномен описан в исследованиях с использованием технологии FRET-ПЦР для выявления мутаций, приводящих к макролидустойчивости у *M. genitalium*, непосредственно в клинических образцах [20].

Несмотря на то, что обследованный контингент входит в группу риска возникновения вспышек микоплазменной инфекции (молодые пациенты до 35 лет, организованный коллектив), в данном исследовании представлен клинический материал, поступивший из различных военных частей в разные временные промежутки, что свидетельствует о возможности спорадически возникающих устойчивых штаммах.

Известно, что данные мутации приводят к нарушению связывания макролидных антибиотиков с консервативным участком-петлей V домена 23S рРНК и, тем самым к формированию устойчивости к препаратам данной группы у различных видов грамотрицательных микроорганизмов [21]. Четкая зависимость между наличием замен в описанных позициях и повышенным уровнем устойчивости к макролидам установлена для различных видов бактерий [22, 23]. В экспериментах *in vitro* с использованием селективного культивирования референтного штамма *M. pneumoniae* M129 в присутствии субингибирующих концентраций различных макролидных антибиотиков получены профили резистентности четко коррелирующие с характером нуклеотидных замен. Изоляты, имеющие мутации в позиции 2063 и 2064 показывают высокие уровни МПК к антибиотикам группы макролидов и относятся к так называемому MLS_B фенотипу, проявляя дополнительно устойчивость к линкозамидам и стрептограмину В. Исследователи отмечают, что штаммы, несущие мутации в позиции А2063С демон-

стрируют более высокие значения минимальной подавляющей концентрации (МПК) (> чем в 16 раз), к 14-членным макролидам: эритромицину и кларитромицину, в сравнении с азитромицином (МПК=16 $\mu\text{g/ml}$). Существенной разницы между уровнями резистентности в отношении 14- и 15-членных макролидов профиль-А2063/2064G не имеет, демонстрируя значения МПК в пределах 64-256 $\mu\text{g/ml}$. Мутация, характеризующаяся генотипом С2617G, показывает сравнительно небольшие значения МПК к эритромицину и кларитромицину (МПК=1-8 $\mu\text{g/ml}$), а также значительно низкие показатели для азитромицина (МПК=0,03 $\mu\text{g/ml}$) [12].

В связи с тем, что *M. pneumoniae* имеет один рибосомный оперон в геноме, подобные мутации являются доминантными, и резистентность в результате таких замен будет выявляться и эволюционно закрепляться значительно чаще, чем у других групп бактерий, где рибосомный оперон представлен несколькими копиями. Таким образом, роль замен А2063G, А2064G и С2617G в 23S рРНК в формировании устойчивости *M. pneumoniae* к макролидным антибиотикам является однозначно установленной, а разработанный метод для определения мутаций устойчивости является достаточно чувствительным, имеет 100% специфичность и не требует предварительного культивирования микроорганизма. По сравнению с описанными в литературе молекулярно-генетическими методами, такими как классическое секвенирование по Сэнгеру [5], пиросеквенирование [26] или анализ полиморфизма длины рестриционных фрагментов (RFLP) [27], разработанный метод обладает классическими преимуществами, характерными для ПЦР-РВ: работает в мультиплексном варианте, позволяя выявлять все возможные варианты мутаций, является одноэтапным и не требует осуществ-

Таблица 2. Характеристика пациентов с выделенными макролидорезистентными *M. pneumoniae*

№ клин. образца	Пациент	Возраст	Дата выделения	Клинический материал	Генотип(ы) выявленные с использованием:	
					Р2Р ПЦР-РВ	Секвенирование
10	Е.Я.В.	22	15.03.2016	мокрота	A2063G/A2064G	A2063G
20	К.А.А.	20	27.02.2016	мокрота	A2063G/A2064G	A2064G
11	Г.В.А.	21	29.02.2016	мокрота	WT и A2063G/A2064G	WT
21	А.З.С.	18	15.07.2016	мокрота	A2063G/A2064G	A2063G
22	Е.Н.П.	20	26.12.2016	мокрота	C2617G	C2617G

вления манипуляций с продуктами амплификации, что упрощает анализ и снижает риск контаминации. Учитывая высокий рост резистентности к макролидам у *M. pneumoniae* в различных странах Европы и Азии, целесообразно проводить рутинный скрининг положительных образцов на выявление устойчивости к препаратам этой группы в России [24, 25].

Заключение

В ходе проведенного молекулярно-генетического скрининга образцов мокроты и соскобов с задней стенки глотки, выделенных от пациентов с внебольничной пневмонией, содер-

жащих ДНК *M. pneumoniae*, нами впервые выявлено четыре случая наличия типичных мутаций в 23S рРНК, связанных со снижением чувствительности к макролидам. Полученные данные свидетельствуют о возможности формирования «классических» механизмов устойчивости к антибиотикам макролидного ряда у *M. pneumoniae*. Разработанный нами подход может быть использован для быстрого выявления мутаций и прогнозирования возможной устойчивости, респираторных микоплазм к этим антибиотикам, являться дополнительным инструментом в тактике подбора адекватной терапии, особенно в случаях возникновения вспышек в организованных коллективах.

Литература

- Community-acquired pneumonia in adults: practical recommendations for diagnosis, treatment and prevention. Chuchalin A.G., ed. M.: Medicina, 2010. 107 p. Russian. (Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике. Под ред. акад. РАМН Чучалина А.Г. М.: Медицина, 2010. 107 с.).
- Kuchmin A.N., Akimkin V.G., Sinopalnikov A.I. Diagnostics, treatment and prevention of community-acquired pneumonia among military personnel of the Ministry of Defence of Russian Federation. Methodology guidelines GVMU MO RF. M.: GVKG im. N.N. Burdenko. 2010. 66 p. Russian. (Кучмин А.Н., Акимкин В.Г., Синопальников А.И. Диагностика, лечение и профилактика внебольничной пневмонии у военнослужащих МО РФ. Методические указания ГВМУ МО РФ. М.: ГVKГ им. Н.Н. Бурденко. 2010. 66 с.).
- Zhogolev S.D., Ogarkov P.I., Zhogolev K.D., et al. Epidemiology and prevention of community-acquired pneumonia among military personnel. Voenno-meditsinskij zhurnal. 2013;11:55-60. Russian. (Жоголев С.Д., Огарков П.И., Жоголев К.Д. и соавт. Эпидемиология и профилактика внебольничной пневмонии у военнослужащих. Военно-медицинский журнал. 2013;11:55-60.).
- Bobylev A.A., Rachina S.A., Edelstein I.A., et al. Description of the outbreak of *Mycoplasma pneumoniae* infection in the Smolensk region. Pul'monologija. 2013;5:97-100. Russian. (Бобылев А.А., Рачина С.А., Эйдельштейн И.А. и соавт. Описание вспышки инфекции, вызванной *Mycoplasma pneumoniae*, в Смоленской области. Пульмонология. 2013;5:97-100.).
- Community-acquired pneumonia in adults: practical recommendations for diagnosis, treatment and prevention. Chuchalin A.G., ed. M.: Medicina, 2010. 107 p. Russian. (Внебольничная пневмония у взрослых: практические рекомендации по диагностике, лечению и профилактике. Под ред. акад. РАМН Чучалина А.Г. М.: Медицина, 2010. 107 с.).
- Ovchinnikov Ju.V., Zajcev A.A., Sinopalnikov A.I. Diagnosis, treatment and vaccine prophylaxis of community-acquired pneumonia among military personnel. Methodology guidelines GVMU MO RF. M.: GVKG im. N.N. Burdenko. 2015. 66 p. Russian. (Овчинников Ю.В., Зайцев А.А., Синопальников А.И. и соавт. Диагностика, лечение и вакцинопрофилактика внебольничной пневмонии у военнослужащих. Методические указания ГВМУ МО РФ. М.: ГVKГ им. Н.Н. Бурденко 2015. 61 с.).
- 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. J Clin Microbiol. 2012;50(10):3402-3405.
- Mulholland S., Gavranich J., Gillies M., et al. Antibiotics for community-acquired lower respiratory tract infections secondary to *Mycoplasma pneumoniae* in children. Cochrane Database Syst Rev. 2012;12(9):CD004875.
- 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. International Journal of Infectious Diseases. 2014;29:197-199.
- Li X., Atkinson T., Hagood J., et al. Emerging macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae* in children: detection and characterization of resistant isolates. Pediatric Infectious Diseases Journal. 2009;28(8):693-696.
- Averbuch D., Hidalgo-Grass C., Moses A., et al. Macrolide resistance in *Mycoplasma pneumoniae*, Israel, 2010. Emerg Infect Dis. 2011;17(6):1079-1082.
- Bébéar C.M., Pereyre S. Mechanisms of drug resistance in *Mycoplasma pneumoniae*. Curr Drug Targets Infect Disord. 2005;5(3):263-271.
- 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.
- Dumke R., von Baum H., Lück P., et al. Occurrence of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* strains in Germany. Clin Microbiol Infect. 2010;16(6):613-616.
- Li SL, Sun HM, Zhu BL, et al. Whole Genome Analysis Reveals New Insights into Macrolide Resistance in *Mycoplasma pneumoniae*. Biomed Environ Sci. 2017;30(5):343-350.
- Spuesens E., Meijer A., Bierschenk D., et al. Macrolide resistance determination and molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* in respiratory specimens collected between 1997 and 2008 in The Netherlands. J Clin Microbiol. 2012;50(6):1999-2004.
- 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. J Antimicrob Chemother. 2009;64(1):52-58.
- Edelstein I.A., Edelstein M.V., Romanov A.V., et al. Detection of macrolide-resistance mutations in 23S rRNA gene of *Mycoplasma pneumoniae* using a novel real-time PCR assay. Tihookeanskij medicinskij zhurnal. 2015;1:63-66. Russian. (Эйдельштейн И.А., Эйдельштейн М.В., Романов А.В. и соавт. Выявление мутаций устойчивости к макролидам в гене 23S рРНК *Mycoplasma pneumoniae* с помощью полимеразной цепной реакции в режиме реального времени. Тихоокеанский медицинский журнал. 2015;1:63-66.).
- Edelstein I.I., Edelstein M.V., Romanov A.V., et al. Evaluation of Prevalence of Classical Fluoroquinolone Resistance Mechanisms in *Chlamydia trachomatis* Due to Mutations in the Topoisomerase Genes. Klinicheskaja mikrobiologija i antimikrobnaja himioterapija. 2014;16(4):301-307. Russian. (Эйдельштейн И.И., Эйдельштейн М.В., Романов А.В. и соавт. Оценка распространенности «классических» механизмов устойчивости к фторхинолонам у *Chlamydia trachomatis* связанных с мутациями в генах топоизомераз. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2014;16(4):301-307.).
- Touati A., Peuchant O., Jensen J.S. Direct detection of macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* isolates from clinical specimens from France by use of real-time PCR and melting curve analysis. J Clin Microbiol. 2014;52(5):1549-1555.
- Kannan K., Mankin A.S. Macrolide antibiotics in the ribosome exit tunnel: species-specific binding and action. Ann N Y Acad Sci. 2011;1241:33-47.
- Wierzbowski A.K., Nichol K., Laing N. Macrolide resistance mechanisms among *Streptococcus pneumoniae* isolated over 6 years of Canadian Respiratory Organism Susceptibility Study (CROSS) (1998-2004). J Antimicrob Chemother. 2007;60(4):733-740.
- Descours G., Ginevra C., Jacotin N. Ribosomal Mutations Conferring Macrolide Resistance in *Legionella pneumophila*. Antimicrob Agents Chemother. 2017;23:61(3).
- Ishiguro N., Koseki N., Kaiho M. Regional Differences in Prevalence of Macrolide Resistance among Pediatric *Mycoplasma pneumoniae* Infections in Hokkaido, Japan. Jap J Infect Dis. 2016;69(3):186-190.
- Pereyre S., Goret J., Bébéar C. *Mycoplasma pneumoniae*: Current Knowledge on Macrolide Resistance and Treatment. Frontiers Microbiol. 2016;7:974.
- Spuesens E., Hoogenboezem T., Sluijter M., et al. Macrolide resistance determination and molecular typing of *Mycoplasma pneumoniae* by pyrosequencing. J Microbiol Methods. 2010;82(3):214-222.
- 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;48(12):4624-4630.