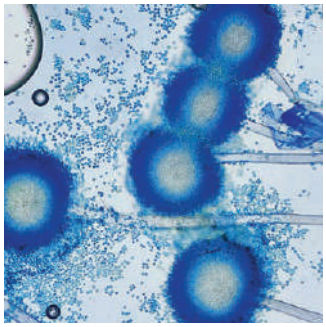
КМАХ
https://cmac-journal.ru

КЛИНИЧЕСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ
И АНТИМИКРОБНАЯ ХИМИОТЕРАПИЯ

Том 27 | №3
2025



Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии
Научно-исследовательский институт антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России
Учредители:
Синопальников А.И.; Пискунов Г.Г.; Козлов Р.С.; Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии (МАКМАХ)
Главный редактор:
Синопальников А.И.
Адрес редакции:
214019, Смоленская обл., г. Смоленск, ул. Кирова, д. 46А
Эл. почта: info@cmac-journal.ru
Адрес для корреспонденции:
214019, г. Смоленск, а/я 5.
Тел./факс: +7(4812)45-06-02
Издатель МАКМАХ:
214019, г. Смоленск, ул. Кирова 46А. www.iacmac.ru
Адрес типографии:
214020, Россия, г. Смоленск, ул. Смольянинова, д. 1
Электронная версия журнала:
https://cmac-journal.ru
Подписка на сайте издателя:
https://service.iacmac.ru
Журнал зарегистрирован Федеральной службой по надзору в сфере связи, информационных технологий и массовых коммуникаций (Роскомнадзор).
Запись в реестре зарегистрированных СМИ: ПИ № ФС 77 – 86269 от 27.11.2023
Не распространяется через предприятия связи
Тираж 3000 экз.
Свободная цена
Дата выхода – 00.00.2025
Журнал входит в Перечень рецензируемых научных изданий, в которых должны быть опубликованы основные научные результаты диссертаций на соискание ученой степени кандидата наук, на соискание ученой степени доктора наук
Присланные в редакцию статьи проходят рецензирование
Мнение редакции может не совпадать с точкой зрения авторов публикуемых материалов
Ответственность за достоверность рекламных публикаций несут рекламодатели
При перепечатке ссылка на журнал обязательна
Журнал является научным изданием для врачей, в связи с чем на него не распространяются требования Федерального закона от 29.12.2010 №436-ФЗ «О защите детей от информации, причиняющей вред их здоровью и развитию»
Иллюстрация для обложки предоставлена: Ольга Николаевна Пинегина (Микробиологическая лаборатория ЕКДЛ SmartLab АО «Группа компаний «МЕДСИ»)
© Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2025.

Содержание

Болезни и возбудители

Козлова И.В., Носов Н.Ю., Юнакова И.В., Плахова К.И., Кубанов А.А.
268 Генетическое разнообразие *Chlamydia trachomatis* на территории России

Лебедева Е.О., Давтян Л.А., Кузнецова И.К., Шутов М.В., Рачина С.А.
275 Респираторно-синцитиальный вирус у взрослых: особенности течения и инновационные методы профилактики

Ларин Е.С., Рачина С.А., Федина Л.В., Зайналабидова Х.Г., Агеевец В.А., Сидоренко С.В., Авдеева А.А., Савочкина Ю.А.
289 Инфекции, вызванные гипервирулентными изолятами *Klebsiella pneumoniae*: актуальность проблемы

Арбузова Н.В., Шпилевая М.В., Катунин Г.Л., Носов Н.Ю.
304 Протеомика *Treponema pallidum*: перспективы улучшения серологической диагностики сифилиса

Кожушная О.С., Воропаев А.Д., Левин П.А., Новичкова Г.А., Солопова Г.Г.
309 Анализ мутаций резистентности цитомегаловируса и клинических особенностей течения ЦМВ-инфекции у иммунокомпрометированных детей

Антимикробные препараты

Тапальский Д.В., Карпова Е.В., Симончик М.В., Пыж А.Э., Голикова М.В.
317 Сравнительная активность меропенема и биапенема и их комбинаций с колистином в отношении грамотрицательных микроорганизмов-продуцентов карбапенемаз различных групп

Арепьева М.А., Кузьменков А.Ю., Старостенков А.А., Колбин А.С., Балыкина Ю.Е., Гомон Ю.М., Курылев А.А., Козлов Р.С.
330 Интегрированная система мониторинга потребления антимикробных препаратов и прогнозирования резистентности на основе динамических моделей

Антибиотикорезистентность

Припутневич Т.В., Нечаева О.В., Бембеева Б.О., Гордеев А.Б., Кузнецова В.А., Скоробогатый А.В., Изюмов Р.В.
342 Изучение антибиотикорезистентности гипервирулентных штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у пациентов перинатальных центров различных регионов Российской Федерации

Фёдорова А.В., Хрульнова С.А., Фролова И.Н., Ветохина А.В., Молчанова И.В., Куцевалова О.Ю., Клясова Г.А.
359 Ванкомицинорезистентные *Enterococcus faecium* в гематологии: чувствительность к антимикробным препаратам и клональное разнообразие

Гультяева Н.А., Виноградова А.Г., Колесникова И.В., Рыжова К.А., Шелковникова О.В.
369 Опыт создания замкнутого цифрового контура для обеспечения непрерывного мониторинга антимикробной резистентности на основе валидированных результатов микробиологической диагностики

Опыт работы

Рачеева Ю.В., Эйдельштейн И.А., Пунин А.А., Ветлицына О.В., Ашакевич Т.П., Романов А.В., Козлов Р.С.
390 Распространенность *Mycoplasma pneumoniae* и *Chlamydophila pneumoniae* у пациентов с обострением ХОБЛ в осенне-зимний период 2022–2023 гг. в Смоленской области

Любимова Л.В., Павлова С.И., Любимов Е.А., Микишанина Е.А.
395 Динамика антибиотикорезистентности возбудителей перипротезной инфекции крупных суставов до и после пандемии COVID-19

Казюлина А.А., Грачева А.Н., Токаев Т.К., Синицын М.В., Елисеев П.И., Тюлькова Т.Е., Загоскин Ю.Д., Григорьев Т.Е., Васильева И.А.
406 Оценка бактерицидного действия объемных пористых композиционных материалов, импрегнированных серебром, на *Mycobacterium tuberculosis*

Данилов Д.И., Савочкина Ю.А., Эйдельштейн И.А., Адешкина Н.И., Олейник О.Н., Гордукова М.А., Шипулин Г.А.
417 Выявление устойчивых к макролидам *Mycoplasma pneumoniae* с помощью быстрых молекулярно-генетических методов: разработка и валидация диагностического ПЦР-теста

КМАХ
https://cmac-journal.ru
КЛИНИЧЕСКАЯ МИКРОБИОЛОГИЯ
И АНТИМИКРОБНАЯ ХИМИОТЕРАПИЯ
Том 27 | №3
2025

DOI: 10.36488/cmac.2025.3.417-424

Оригинальная статья

Выявление устойчивых к макролидам *Mycoplasma pneumoniae* с помощью быстрых молекулярно-генетических методов: разработка и валидация диагностического ПЦР-теста

Данилов Д.И.[1], Савочкина Ю.А.[1], Эйдельштейн И.А.[2], Адешкина Н.И.[1], Олейник О.Н.[1], Гордукова М.А.[3], Шипулин Г.А.[1]

[1] ФГБУ «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» ФМБА России, Москва, Россия
[2] НИИ антимикробной химиотерапии ФГБОУ ВО СГМУ Минздрава России, Смоленск, Россия
[3] ГБУЗ «Детская городская клиническая больница № 9 им. Г.Н. Сперанского», Москва, Россия

Контактный адрес:
Дмитрий Игоревич Данилов
Эл. почта: danilov.i.dmitry@gmail.com

Ключевые слова: *Mycoplasma pneumoniae*, резистентность к макролидам, мутации, ген 23S рРНК, ПЦР в реальном времени, валидация теста.

Конфликт интересов: авторы заявляют об отсутствии конфликтов интересов.

Внешнее финансирование: исследование проведено без внешнего финансирования.

Цель. Разработать и провести первый этап валидации ПЦР-теста для выявления ключевых мутаций в V домене гена 23S рРНК *M. pneumoniae* (A2058G, A2059G, A2062C), позволяющего определять мутации, опосредующие устойчивость к макролидам у *M. pneumoniae* в образцах нативного биоматериала.

Материалы и методы. В исследование включена панель образцов ДНК *M. pneumoniae* (n = 107) из коллекции многоцентрового исследования DeMaRes (https://amrcloud.net/ru/project/demares/), а также использован нативный биоматериал (n = 52): орофарингеальные мазки (n = 45), трахеальный аспират (n = 4) и бронхоальвеолярный лаваж (n = 3), полученный за период с марта по апрель 2025 г. из ГБУЗ «ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского». Выделение нуклеиновых кислот из нативного биоматериала проводили с помощью набора «РИБО-преп».

Характер мутаций в гене 23S рРНК *M. pneumoniae* предварительно определяли посредством секвенирования по Сэнгеру, который использовали в качестве референсного метода. Концентрацию контрольных плазмид, необходимых для оценки аналитической чувствительности созданного теста, определяли с помощью метода цифровой капельной ПЦР.

Результаты. Разработанный ПЦР-тест успешно прошел первый этап валидации, продемонстрировав возможность надежного выявления ключевых мутаций в V домене гена 23S рРНК *M. pneumoniae* при анализе различных типов биологического материала, включая орофарингеальные мазки, мокроту, трахеальный аспират и бронхоальвеолярный лаваж. Полученные результаты подтверждают способность теста идентифицировать макролидорезистентные штаммы *M. pneumoniae* непосредственно в клинических образцах, продемонстрировав 100% диагностическую чувствительность и диагностическую специфичность в выявлении ДНК *M. pneumoniae* и основных мутаций A2058G, A2059G и A2062C, детерминирующих устойчивость к макролидам. Аналитическая чувствительность для всех мишеней составила 1×10^3 копий/мл. Среди мутаций, выявленных в образцах, содержащих *M. pneumoniae*, преобладала мутация A2058G – 29,1%, тогда как остальные мутации были идентифицированы в 7% случаев. Результаты полностью соответствовали данным секвенирования участка 23S рРНК по методу Сэнгера.

Выводы. Разработанный ПЦР-тест позволяет выявлять возбудителя и маркеры резистентности *M. pneumoniae* к макролидам непосредственно в биологическом материале. Результаты первого этапа валидации теста указывают на его высокие диагностические характеристики и позволяют ожидать, что он будет успешно применяться в лабораторной диагностике. Набор реагентов для выполнения данного ПЦР-теста «АмплиТест®*M. pneumoniae*/MRMP» на момент подготовки публикации проходит регистрацию в качестве медицинского изделия для использования в диагностике *in vitro* в России.

Original Article

Development and validation of a PCR test for rapid molecular diagnosis of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae*

Danilov D.I.[1], Savochkina Yu.A.[1], Edelstein I.A.[2], Adeshkina N.I.[1], Oleynik O.N.[1], Gordukova M.A.[3], Shipulin G.A.[1]

[1] Centre for Strategic Planning and Management of Biomedical Health Risks, Moscow, Russia
[2] Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk, Russia
[3] Children's City Clinical Hospital No. 9 named after G.N. Speransky, Moscow, Russia

Contacts:
Dmitry I. Danilov
E-mail: danilov.i.dmitry@gmail.com

Objective. To develop and conduct the first stage of validation for a PCR test that identifies key mutations in the V domain of the 23S rRNA gene of *M. pneumoniae* (A2058G, A2059G, and A2062C). This test allows for the identification of macrolide-resistant *M. pneumoniae* strains in samples of native biological material.

Key words: *Mycoplasma pneumoniae*, macrolide resistance, mutations, 23S rRNA gene, real time PCR, validation study.

Conflicts of interest: all authors report no conflicts of interest relevant to this article.

External funding source: no external funding received.

Materials and methods. The study included a panel of *M. pneumoniae* DNA samples (n = 107) from the collection of the DeMaRes multicenter study, as well as native material (n = 52). This included oropharyngeal swabs (n = 45), tracheal aspiration (n = 4), and bronchial lavage (n = 3), which were obtained from March to April 2025 at G.N. Speranskiy Children Hospital No 9, Moscow. Nucleic acids were extracted from the native material using a RIBO-prep kit. The mutations in the 23S rRNA gene of *M. pneumoniae* was preliminarily determined using Sanger sequencing techniques and a modified PCR technique, which involved quenching fluorescence of the probe with primer. The concentration of control plasmids in order to determine the analytical sensitivity of the developed test was carried out using digital drip PCR.

Results. The PCR test demonstrated 100% diagnostic sensitivity and specificity in detecting A2058G, A2059G, and A2062C mutations as well as wild-type *M. pneumoniae* DNA. Analytical sensitivity for all targets was 1×10^3 copies/ml. Among clinical samples with *M. pneumoniae* presence, the A2058G mutation prevailed at 35,7%, with A2059G and A2062C being less common. Results were consistent with sequencing data.

Conclusions. The developed PCR test allows for the direct identification of the pathogen and *M. pneumoniae's* resistance markers to macrolides in biological material. The results demonstrate its high diagnostic capabilities and suggest that it will be successful in laboratory diagnostics.

Введение

Mycoplasmoides pneumoniae (Mycoplasma pneumoniae) – один из основных возбудителей внебольничной пневмонии у взрослых и у детей, так, среди госпитализированных детей школьного возраста ее доля может составлять от 10 до 40%, увеличиваясь в периоды эпидемического подъема [1]. В последние годы во всем мире происходят периодические эпидемические подъемы заболеваемости, вызванные *M. pneumoniae,* в том числе эпидемия в Китае в 2023 г., вспышки в США и в различных странах Европы, включая Россию, в осенне-зимний период 2023 и 2024 г. [1–3].

Современные исследования подтверждают значительную роль *M. pneumoniae* в этиологической структуре внебольничной пневмонии (ВП) [4]. Согласно данным многоцентровых исследований в США, данный возбудитель занимает второе место по частоте выявления после *Streptococcus pneumoniae* [5]. В различных регионах мира доля *M. pneumoniae* среди случаев ВП существенно варьирует. Так, в исследованиях среди взрослого населения США и Европы этот показатель составляет 7–15%, тогда как среди детей может достигать 30%. Высокая распространенность *M. pneumoniae* (18,3%) зарегистрирована в азиатских странах, где данный патоген занимает лидирующее положение среди атипичных возбудителей ВП [6]. Как правило, микоплазменная ВП отличается нетяжелым течением и не требует госпитализации. Однако у детей младше 5 лет, несмотря на редкое развитие микоплазменной инфекции, она протекает тяжелее и характеризуется более выраженной дыхательной недостаточностью, интоксикацией и возникновением внелегочных симптомов, в сравнении с детьми старшего возраста [7].

Отличительной чертой эпидсезона 2023 г. в России стало выраженное доминирование *M. pneumoniae* в этиологии внебольничных пневмоний у детей 7–17 лет [8]. В 2022 г. доля *M. pneumoniae* среди случаев ВП в России возросла до 3,7%, а в 2023 г. был зарегистрирован резкий подъем до 27,6% ($p < 0,001$), что соответствовало 12,6-кратному увеличению числа госпитализаций с микоплазменной инфекцией [3].

Согласно современным клиническим рекомендациям, препаратами выбора для антимикробной терапии инфекций, вызванных *M. pneumoniae,* являются макролиды (азитромицин, кларитромицин), а также альтернативные препараты – респираторные фторхинолоны (левофлоксацин, моксифлоксацин) и тетрациклины (доксициклин) [9]. Макролиды приобретают важное значение в педиатрической практике благодаря их минимальному риску побочных эффектов для детей и подростков. В свою очередь фторхинолоны противопоказаны детям до 18 лет, а тетрациклины противопоказаны до 8 лет. В отделениях неотложной помощи США макролиды составляют приблизительно 50% от общего числа назначаемых антибиотиков для лечения респираторных инфекций у детей и подростков. Широкое применение макролидов создает селективное давление, способствующее возникновению штаммов *M. pneumoniae* с устойчивостью к данной группе антибиотиков, особенно в периоды вспышек инфекций [10].

Особую проблему представляет растущая резистентность *M. pneumoniae* к макролидам, которая в некоторых регионах Азии достигает от 60 до 90% [6, 11]. Это существенно осложняет терапию и требует пересмотра существующих клинических рекомендаций по лечению ВП. В настоящее время прогрессирующий рост резистентности *M. pneumoniae* к макролидам регистрируется в различных регионах мира, что требует пересмотра существующих терапевтических алгоритмов [12]. Несмотря на то, что основная локализация макролидорезистентных штаммов *M. pneumoniae* (MRMP) сосредоточена в Восточно-Тихоокеанском регионе, эпидемиологические данные свидетельствуют о постепенном

увеличении их распространенности в европейских странах [13]. Во время эпидемических подъемов заболеваемости доля MRMP в некоторых регионах Европы может достигать 26% [13, 14]. Примечательно, что истинный уровень резистентности к макролидам в Европе, вероятно, недооценивается вследствие недостаточного охвата лабораторной диагностики и ограниченного мониторинга антибиотикорезистентности [14].

В современных исследованиях встречаются данные о том, что инфекции, вызванные MRMP, характеризуются длительным течением по сравнению с инфекциями, связанными с макролидочувствительными *M. pneumoniae*. MRMP-инфекции приводят к более длительному пребыванию пациентов в стационаре, что связано с пролонгированным лихорадочным синдромом и более выраженными клиническими проявлениями заболевания [14, 15].

Фенотип MRMP формируется за счет специфических мутаций в V домене гена 23S рРНК. Наиболее распространенными являются мутации A2063G и A2064G (соответствующие позициям A2058G и A2059G в нумерации по *E. coli* – далее в тексте нумерация по *E. coli*) [14], которые обеспечивают высокоуровневую резистентность к 14- и 15-членным макролидам. Реже встречается мутация A2067C (A2062C в нумерации по *E. coli* – далее в тексте нумерация по *E. coli*), которая позволяет приобрести устойчивость к ограниченному спектру макролидов и при которой сохраняется чувствительность к некоторым представителям этой группы. Эти точечные замены в рибосомальной РНК нарушают связывание антибиотика с мишенью, что приводит к клинически значимому снижению эффективности терапии [16]. Согласно открытым данным проекта DeMaRes, доля MRMP в России за период с 2015 по 2019 г. составила 20,9%. За аналогичный период с 2020 по 2024 г. доля резистентных к макролидам *M. pneumoniae* составила 25,8%, что говорит о значимом росте и накоплении резистентности MRMP-штаммов в России. Распространение однонуклеотидных замен в V домене гена 23S рРНК у штаммов *M. pneumoniae* устойчивых к макролидам в России за рассмотренные периоды не отличалась от общемировой ситуации [17].

В период с 2015 по 2019 г. доминирующей мутацией являлась A2058G, распространенность которой составляла 83,5%. На мутацию A2059G приходилось 12,0%, в то время как сочетание мутаций A2058G и A2059G составляло 1,4%, а мутация A2062C – 1,0%. Доля других сочетаний перечисленных мутаций не превышала 1%. В последующий аналогичный 4-х летний период с 2020 по 2024 г. среди MRMP также доминировала мутация A2058G, однако ее распространенность увеличилась до 97,9%. Мутация A2059G была выявлена в 1,9% случаев, а сочетание двух указанных однонуклеотидных замен составило менее 1%. Такая динамика демонстрирует увеличение распространенности мутации A2058G в гене 23S рРНК у *M. pneumoniae* из биологического материала от пациентов в России и сокращение доли других генетических детерминант резистентности в популяции [18].

Культивирование *M. pneumoniae* в условиях бактериологической лаборатории представляет собой методически сложный, длительный и дорогостоящий процесс, что делает его непригодным для использования в рутинной практике диагностики инфекционных заболеваний. Ввиду существенных ограничений культурального метода исследования, основное значение в диагностике микоплазменных инфекций приобрели методы амплификации нуклеиновых кислот, такие как ПЦР в «реальном времени» и изотермическая амплификация LAMP [19].

Опыт зарубежных разработок показывает высокую востребованность методов выявления MRMP с помощью ПЦР в «реальном времени» и удобство использования готовых коммерческих решений [20]. Одним из примеров таких решений является набор реагентов «*Mycoplasma Pneumoniae* and Macrolides-Resistant Strain Nucleic Acid Test Kit» китайского производителя «Mole Bioscience», где реализована система детекции ключевых мутаций в гене 23S рРНК A2058G, A2059G [14]. Альтернативный вариант – набор реагентов Mp-DR real-time PCR корейского производителя «Kogene» предназначен для выявления только одной самой распространенной мутации A2058G [21], несмотря на ограниченный спектр выявляемых маркеров MRMP, тест нашел свое применение в клинической практике. Дальнейшее развитие технологий демонстрирует компания из Японии MIZUHO MEDY Co., Ltd., предлагающая полностью автоматизированное решение в виде количественной ПЦР с целью определения мутаций в V домене гена 23S рРНК A2058G, A2059G и A2062C [20].

В Российской Федерации в настоящее время не зарегистрировано тестов для выявления мутаций, детерминирующих резистентность к макролидам у *M. pneumoniae*. Исходя из сказанного мы ожидаем, что разработанный нами тест на основе ПЦР будет востребован в лабораторной диагностике после проведения соответствующей процедуры регистрации его как медицинского изделия.

Цель исследования – провести первый этап валидации разработанного ПЦР-теста для выявления ключевых мутаций в V домене гена 23S рРНК *M. pneumoniae* (A2058G, A2059G, A2062C), позволяющего определять MRMP в образцах биоматериала человека (орофарингеальные мазки, мокрота, ТА и БАЛ).

Материалы и методы

Биологический материал

Панель образцов ДНК *M. pneumoniae* (n = 107), выделенная из биоматериала: орофарингеальные мазки (n = 96) и мокрота (n = 11), была выбрана из коллекции многоцентрового исследования DeMaRes [18] и использована для оценки диагностических характеристик разработанного ПЦР-теста. Первичный скрининг коллекции на наличие мутаций, детерминирующих резистентность, осуществляли с использованием модифицированной методики ПЦР-РВ с эффектом гашения флуоресценции зонда праймером (патент № 2646123). Перед проведе-

нием ПЦР-тестирования с помощью разработанного набора реагентов все образцы были зашифрованы.

Другую группу анализируемых образцов ДНК выделяли из биологического материала: орофарингеальные мазки (n = 45), трахеальный аспират (n = 4) и бронхоальвеолярный лаваж (n = 3), полученного за период с марта по апрель 2025 г. из ГБУЗ «ДГКБ № 9 им. Г.Н. Сперанского» была выделена ДНК с использованием набора «РИБО-преп» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва).

Контрольной группой отрицательных образцов без содержания ДНК *M. pneumoniae* служили образцы нативного биоматериала: орофарингеальные мазки (n = 66) от лиц с инфекцией нижних или верхних дыхательных путей. Выделение нуклеиновых кислот из образцов проводили с использованием набора «РИБО-преп» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, Москва). Отсутствие и наличие ДНК *M. pneumoniae* в биологическом материале устанавливали с помощью набора «АмплиСенс *Mycoplasma pneumoniae/Chlamydophila pneumoniae*-FL» (ЦНИИ эпидемиологии, Россия). Хранение проб ДНК, выделенных из образцов, осуществляли при температуре от +2°C до +8°C в течение 2 ч. или при температуре от -16°C до -20°C длительно.

ПЦР-тест для определения мутаций в гене 23S рРНК *M. pneumoniae*

Для детекции однонуклеотидных замен A2058G, A2059G, A2062C были сконструированы TaqMan зонды с включением LNA оснований, прямой и обратный праймеры к целевому участку гена 23S рРНК *M. pneumoniae*. Мультиплексная ПЦР-смесь также включала праймеры и зонды для амплификации и детекции маркера *M. pneumoniae* – фрагмента гена-мишени putative lipoprotein, и для ДНК внутреннего контрольного образца (ВКО). Бактериофаг λ, содержащий искусственную вставку в геноме, был использован в качестве ВКО, что позволяло детектировать ингибирование в исследуемых образцах после этапа выделения нуклеиновых кислот. ПЦР проводили по следующей программе: 95° в течение 15 мин.; 40 циклов: 95° в течение 10 сек., 60° в течение 20 сек. – считывание флуоресцентного сигнала, 72° в течение 10 сек.

Положительные контроли для ПЦР-теста

Конструирование ДНК-вставки для положительного контроля проводили методом безматричной сборки с использованием трех пар перекрывающихся праймеров (прямых и обратных) с последующей трехэтапной ПЦР-амплификацией. Полученный ампликон лигировали в вектор pGEM-T (Promega Corporation, США) и трансформировали в компетентные клетки *E. coli*. Выделение плазмидной ДНК из компетентных клеток проводили с помощью набора Plasmid mini Kit (Qiagen, Германия) в соответствии с инструкцией производителя.

Количественное определение концентрации плазмидной ДНК проводили методом цифровой капельной ПЦР (ddPCR) с использованием системы QX200 Droplet Digital PCR System (Bio-Rad, США). Известные концентрации плазмидных ДНК, использованные на предыдущем этапе, были применены для приготовления положительных контрольных образцов: были приготовлены монокомпонентные контроли, содержащие по отдельности каждую из целевых мутаций и ДНК *M. pneumoniae*, а также объединенного контрольного образца, содержащего смесь всех указанных плазмид в равных концентрациях 2×10^4 коп/мл.

Для оценки аналитической чувствительности теста были приготовлены модельные образцы. Их получали путем добавления плазмидных контролей заданной концентрации к образцам биоматериала, не содержащего ДНК *M. pneumoniae,* непосредственно перед началом экстракции нуклеиновых кислот с использованием наборов реагентов «РИБО-преп» и «Магно-Сорб-Комбо» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, г. Москва). Тестирование проводили для различного биологического материала, включая мокроту, бронхоальвеолярный лаваж (БАЛ), трахеальный аспират, а также мазки со слизистой оболочки носоглотки и ротоглотки. Экстракцию ДНК из модельных образцов, орофарингеальных мазков, проводили также с использованием комплекта реагентов «ДНК Аллегро М» (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России, г. Москва).

Секвенирование последовательности ДНК по методу Сэнгера

Для секвенирования фрагмента гена 23S рРНК в образцах ДНК биологического материала и ДНК-вставки положительных контролей по методу Сэнгера, применяли набор BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и генетический анализатор Applied Biosystems 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific, США). Данная референсная методика позволила верифицировать характер мутаций в V домене гена 23S рРНК *M. pneumoniae*, подтвердить их отсутствие и определить нуклеотидную последовательность рекомбинантной вставки положительных контролей.

Статистическая обработка

Для статистической обработки полученных результатов использовали программу OriginPro.v. 9.1 (OriginLab Corporation, США). Доверительные интервалы рассчитывали по методу Клоппера-Пирсона с доверительной вероятностью равной 95% с использованием калькулятора на портале MedCalc (MedCalc Software Ltd., Бельгия).

Все участники исследования подписывали информированное согласие. Исследование одобрено локальным этическим комитетом.

Результаты

Разработанный набор реагентов для выявления генетических маркеров MRMP позволяет с помощью одной мультиплексной ПЦР в режиме реального времени определять наличие ДНК *M. pneumoniae* и обнаружи-

вать основные мутации в гене 23S рРНК, определяющие устойчивость этого возбудителя к макролидам – A2058G, A2059G, A2062C, а также сочетание мутаций A2058G/A2059G. Тест включает использование внутреннего контрольного образца (ВКО) при проведении экстракции ДНК. Мутации A2058G и A2059G детектируются отдельно по двум различным каналам флуоресцентной детекции, мутация A2062C и сочетание мутаций A2058G/A2059G регистрируются по третьему каналу флуоресцентной детекции.

Аналитическую чувствительность для каждой из мишеней оценивали при помощи положительных модельных образцов, содержащих ВКО. Тестировали образцы с содержанием ДНК-мишеней в диапазоне концентраций от 1 × 10^4 до 2 ×10^2 копий/мл. В результате проведенного анализа модельных образцов была установлена аналитическая чувствительность теста при выявлении ДНК *M. pneumoniae* с мутациями A2058G, A2059G и A2062C в V домене гена 23S рРНК, так и без содержания перечисленных мутаций. При использовании наборов реагентов для экстракции нуклеиновых кислот «Магно-Сорб-Комбо» с помощью автоматической станции и «РИБО-преп» при экстракции вручную показатель аналитической чувствительности для всех типов исследуемого биоматериала – мокроты, трахеального аспирата, БАЛ и мазков из рото- и носоглотки – составил 1 × 10^3 копий/мл. Для набора «ДНК Аллегро М», применявшегося для выделения нуклеиновых кислот из модельных образцов мазков, показатель аналитической чувствительности составил 2 × 10^3 копий/мл. Пример результатов оценки аналитической чувствительности ПЦР-теста представлен в Таблице 1. Положительные результаты для всех повторов обозначены зеленым цветом, наличие отрицательных результатов для части образцов – оранжевым и красным цветом.

Диагностическую чувствительность (ДЧ) и специфичность (ДС) разработанного теста оценивали путем анализа спектра мутаций в домене V гена 23S рРНК *M. pneumoniae*. Исследование включало как образцы с детектируемой ДНК *M. pneumoniae* при наличии мутаций; ДНК *M. pneumoniae* при отсутствии мутаций, так и отрицательную контрольную группу образцов, без содержания ДНК возбудителя. Проведенное сравнительное исследование продемонстрировало 100% соответствие результатов, полученных с помощью разработанного ПЦР-теста с результатами методов сравнения – секвенированием по Сэнгеру и ПЦР с использованием набора «АмплиСенс *Mycoplasma pneumoniae/Chlamydophila pneumoniae*-FL». Аналогичное полное совпадение (100%) отрицательных результатов ПЦР наблюдалось при тестировании контрольной группы образцов (n = 66), не содержащих ДНК *M. pneumoniae*, с результатами, полученными при использовании набора «АмплиСенс *Mycoplasma pneumoniae/Chlamydophila pneumoniae*-FL». Показатели ДЧ, ДС и точность с 95% доверительным интервалом показаны в Таблице 2.

ПЦР-тест позволил идентифицировать различные профили мутаций в гене 23S рРНК *M. pneumoniae* при

Таблица 1. Показатели оценки аналитической чувствительности ПЦР-теста при анализе образцов мокроты при экстракции нуклеиновых кислот с помощью «Магно-Сорб-Комбо» на автоматической станции

Концентрация (копий/мл) ПКО в образце мокроты	ПЦР-тест MRMP				
	A2058G	A2059G	ДНК *M. pneumoniae*	ВКО	A2062C
1 × 10^4	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
2 × 10^3	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
1 × 10^3	12/12	12/12	12/12	12/12	12/12
500	12/11	12/11	12/12	12/12	12/10
200	12/8	12/11	12/8	12/12	12/8

Таблица 2. Показатели диагностической чувствительности, диагностической специфичности и точности разработанного ПЦР-теста по отношению к методу сравнения

Показатель / аналит	Мутации в гене 23S рРНК *M. pneumoniae*	ДНК *M. pneumoniae*
Положительные	73	158
Отрицательные	85	66
Ложноположительные	0	0
Ложноотрицательные	0	0
Диагностическая чувствительность (95% ДИ)	100% (95,0–100%)	100% (97,7–100%)
Диагностическая специфичность (95% ДИ)	100% (95,8–100%)	100% (94,6–100%)
Точность (95% ДИ)	100% (97,7–100%)	100% (98,4–100%)

Таблица 3. Распределение мутаций в V домене гена 23S рРНК у протестированной коллекции образцов ДНК *M. pneumoniae*

Биологический материал	A2058G	A2059G	A2058G + A2059G	A2062C	A2059G + A2062C	A2058G + A2059G + A2062C	ДНК *M. pneumoniae* без мутаций	Всего
Фарингеальный мазок	38	16	5	2	2	2	75	140
Мокрота	3	-	-	-	-	-	8	11
БАЛ	1	-	-	-	-	-	2	3
ТА	4	-	-	-	-	-	-	4
Всего	46	16	5	2	2	2	85	158

БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж; ТА – трахеальный аспират.

исследовании образцов ДНК из коллекции НИИАХ (Смоленск) и нативного материала из ДГКБ № 9 (Москва), что отражает разнообразие циркулирующих штаммов *M. pneumoniae* в России. Различные мутации в V домене гена 23S рРНК *M. pneumoniae* были выявлены в 73 образцах, содержащих ДНК возбудителя. Среди выявленных мутаций доминировала A2058G в 46 случаях (29,1%) из 158 образцов, в которых была детектирована ДНК *M. pneumoniae*. В остальных 85 образцах (53,8%), содержащих ДНК *M. pneumoniae,* не обнаружено исследуемых мутаций. Остальные мутации встречались реже – в совокупности они были идентифицированы в 11 образцах (7,0%). Распределение мутаций у протестированных коллекций ДНК *M. pneumoniae* показано в Таблице 3.

Обсуждение

Результаты, полученные в ходе настоящего исследования, демонстрируют высокие аналитические и диагностические показатели разработанного ПЦР-теста для детекции мутаций A2058G, A2059G и A2062C в гене 23S рРНК, детерминирующих резистентность к макролидам, как и для детекции ДНК гена-маркера *M. pneumoniae* с целью выявления ДНК возбудителя инфекции.

Согласно данным многоцентрового исследования DeMaRes [18], в период с 2020 по 2025 г. в России зарегистрированы следующие циркулирующие мутации в гене 23S рРНК у *M. pneumoniae* устойчивой к макролидам, выявленной у пациентов с диагнозом ВП: A2058G – 97,9%, A2059G – 1,9% и сочетание этих мутаций (распространенность менее 1%). Ранее, согласно DeMaRes, мутация A2062C регистрировалась в 2018 г. и в 2019 г. в Смоленске и Москве. Таким образом, разработанный ПЦР-тест охватывает спектр самых распространенных мутаций, характерных для MRMP в России. Следует отметить, что выявление редких мутаций A2059G и A2062C подчеркивает необходимость их мониторинга несмотря на то, что A2058G является доминирующей среди MRMP как в России, так и в других странах и регионах.

Заключение

Разработанный ПЦР-тест позволяет выявлять ДНК *M. pneumoniae* и основные мутации устойчивости данного возбудителя к макролидам с высокой аналитической и диагностической чувствительностью, специфичностью и точностью, что дает возможность оценить его как надежный инструмент для выявления генетических маркеров MRMP. Набор реагентов для выполнения теста «АмплиТест® *M. pneumoniae*/MRMP» на момент подготовки публикации проходит регистрацию в качестве медицинского изделия для использования в диагностике *in vitro* в России. Его внедрение в практику позволит улучшить лабораторную диагностику и возможности своевременной оптимизации антимикробной терапии внебольничных пневмоний, особенно в условиях роста резистентности *M. pneumoniae* к макролидам. Полученные результаты подчеркивают важность молекулярного мониторинга резистентности для своевременной коррекции терапевтических стратегий и снижения риска распространения устойчивых штаммов. Внедрение тестов для эффективного выявления генетических маркеров MRMP в рутинную диагностику может стать ключевым шагом в борьбе с антибиотикорезистентностью *M. pneumoniae* в России и за ее пределами.

Благодарность

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории молекулярной эпидемиологии ФГБУ «ЦСП» ФМБА России Гнусаревой Н.И. и Мацвай А.Д. за проведение секвенирования исследуемых образцов по методу Сэнгера.

Работа выполнена в рамках государственного задания № 388-00083-25-03 (шифр «Молекулярные технологии»).

Литература

1. Jia X., Chen Y., Gao Y., Ren X., Du B., Zhao H., et al. Increased *in vitro* antimicrobial resistance of *Mycoplasma pneumoniae* isolates obtained from children in Beijing, China, in 2023. Front Cell Infect Microbiol. 2024;14:1478087. DOI: 10.3389/fcimb.2024.1478087
2. Upsurge of respiratory illnesses among children – Northern China. Available at: www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/2023-DON494. Accessed July 29, 2025.
3. Kokoreva S.P., Razuvaev O.A., Kuprina N.P., Razuvaeva Yu.Yu. Regional features of the etiology of acute respiratory infections in hospitalized children in the period from 2019 to 2023. Infectious diseases: News. Opinions. Training. 2025;14(1):36-41. Russian. (Кокорева С.П., Разуваев О.А., Куприна Н.П., Разуваева Ю.Ю. Региональные особенности этиологии острых респираторных инфекций у госпитализированных детей в период с 2019 по 2023 г. Инфекционные болезни: Новости. Мнения. Обучение. 2025;14(1):36-41.) DOI: 10.33029/2305-3496-2025-14-1-36-41
4. Ulmeanu A.I., Ciuparu G.-E., Matran E.R. Characteristics of *Mycoplasma pneumoniae* pneumonia in Romanian children. Microorganisms. 2025;13(4):883. DOI: 10.3390/microorganisms13040883
5. Jain S., Self W.H., Wunderink R.G., Fakhran S., Balk R., Bramley A.M., et al. Community-acquired pneumonia requiring hospitalization among U.S. adults. N Engl J Med. 2015;373(5):415-427. DOI: 10.1056/NEJMoa1500245
6. Sahanic S., Tymoszuk P., Ausserhofer D., Rass V., Pizzini A., Nordmeyer G., et al. Phenotyping of acute and persistent coronavirus disease 2019 features in the outpatient setting: exploratory analysis of an international cross-sectional online survey. Clin Infect Dis. 2022;75(1):e418-e431. DOI: 10.1093/cid/ciab978
7. Ratchina S.A., Bobylev A.A., Kozlov R.S., Shal E.P., Yatsyshina S.B., Shelyakina O.G. community-acquired pneumonia caused by *Mycoplasma pneumoniae*: literature review and results of the regional study. Kliniceskaa mikrobiologia i antimikrobnaa himioterapia. 2013;15(1):4-13. Russian. (Рачина С.А., Бобылев А.А., Козлов Р.С., Шаль Е.П., Яцышина С.Б., Шелякина О.Г. Особенности внебольничной пневмонии, вызванной *Mycoplasma pneumoniae*: обзор литературы и результаты собственных исследований. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2013;15(1):4-13.)
8. State report on the state of sanitary and epidemiological well-being of the population in the Russian Federation in 2023: State report. Moscow: Federal Service for Surveillance on Consumer Rights Protection and Human Wellbeing, 2024. 364 p. Russian. (Государственный доклад О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2023 году: Государственный доклад. Москва: Федеральная служба по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека, 2024. 364 с.)
9. Russian Respiratory Society, Interregional Association for Clinical Microbiology and Antimicrobial Chemotherapy, Clinical Guidelines. Community-Acquired Pneumonia in Adults. Ministry of Health of the Russian Federation, 2024. Russian. (Российское респираторное общество, Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии Клинические рекомендации. Внебольничная пневмония у взрослых. Министерство Здравоохранения Российской Федерации, 2024.)
10. Meyer Sauteur P.M., Seiler M., Tilen R., Osuna E., Von Wantoch M., Sidorov S., et al. A randomized controlled non-inferiority trial of placebo versus macrolide antibiotics for *Mycoplasma pneumoniae* infection in children with community-acquired pneumonia: trial protocol for the MYTHIC Study. Trials. 2024;25(1):655. DOI: 10.1186/s13063-024-08438-6
11. Tao L.-L., Hu B.-J., He L.-X., Wei L., Xie H., Wang B.-Q., et al. Etiology and antimicrobial resistance of community-acquired pneumonia in adult patients in China. Chin Med J. 2012;125(17):2967-2972. PMID: 22932165.
12. Kim K., Jung S., Kim M., Park S., Yang H.-J., Lee E. Global trends in the proportion of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* infections: a systematic review and meta-analysis. JAMA Netw Open. 2022;5(7):e2220949. DOI: 10.1001/jamanetworkopen.2022.20949
13. Loconsole D., De Robertis A.L., Sallustio A., Centrone F., Morcavallo C., Campanella S., et al. Update on the epidemiology of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* in Europe: a systematic review. Infect Dis Rep. 2021;13(3):811-820. DOI: 10.3390/idr13030073
14. Chen Y., Jia X., Gao Y., Ren X., Du B., Zhao H., et al. Increased macrolide resistance rate of *Mycoplasma pneumoniae* correlated with epidemic in Beijing, China in 2023. Front Microbiol. 2024;15:1449511. DOI: 10.3389/fmicb.2024.1449511
15. Kant R., Kumar N., Malik Y.S., Everett D., Saluja D., Launey T., Kaushik R. Critical insights from recent outbreaks of *Mycoplasma pneumoniae*: decoding the challenges and effective interventions strategies. Int J Infect Dis. 2024;147:107200. DOI: 10.1016/j.ijid.2024.107200
16. Wang N., Xu X., Xiao L., Liu Y. Novel mechanisms of macrolide resistance revealed by in vitro selection and genome analysis in *Mycoplasma pneumoniae*. Front Cell Infect Microbiol. 2023;13:1186017. DOI: 10.3389/fcimb.2023.1186017
17. Wang G., Wu P., Tang R., Zhang W. Global prevalence of resistance to macrolides in *Mycoplasma pneumoniae*: a systematic review and meta-analysis. J Antimicrob Chemother. 2022;77(9):2353-2363. DOI: 10.1093/jac/dkac170
18. The DeMaRes Study. Analysis of the prevalence of macrolide and fluoroquinolone resistance mutations in *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae*. Available at: https://amrcloud.net/ru/project/demares/. Accessed August 2025. Russian. (Исследование «DeMaRes». Анализ распространенности мутаций резистентности к макролидам и фторхинолонам у *Mycoplasma genitalium*

и *Mycoplasma pneumoniae*. Доступно по адресу: https://amrcloud.net/ru/project/demares/. Ссылка активна на август 2025 г.)

19. Edelstein I.A. *Mycoplasma pneumoniae* – modern data on the structure, molecular biologyand epidemiology of the pathogen. Kliniceskaa mikrobiologia i antimikrobnaa himioterapia. 2023;25(4):332-349. Russian. (Эйдельштейн И.А. *Mycoplasma pneumoniae* – современные данные о строении, молекулярной биологии и эпидемиологии возбудителя. Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. 2023;25(4):332-349.) DOI: 10.36488/cmac.2023.4.332-349
20. Ishiguro N., Sato R., Mori T., Tanaka H., Narita M., Nagano T., et al. Point-of-care molecular diagnosis of *Mycoplasma pneumoniae* including macrolide sensitivity using quenching probe polymerase chain reaction. PLoS One. 2021;16(10):e0258694. DOI: 10.1371/journal.pone.0258694
21. Park B., Won E.J., Sung H., Kim M.-N. Detection of macrolide-resistant *Mycoplasma pneumoniae* using the Kogene Mp-DR real-time PCR assay: a clinical validation study. J Microbiol Methods. 2025;230-231:107102. DOI: 10.1016/j.mimet.2025.107102