

УДК 616-022.7:579.887-085.33

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

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

Ключевые слова: микоплазмы, молекулярная диагностика, антибиотикорезистентность.

DETECTION OF MACROLIDE-RESISTANCE MUTATIONS IN 23S rRNA GENE OF *Mycoplasma pneumoniae* USING A NOVEL REAL-TIME PCR ASSAY

I.A. Edelstein¹, M.V. Edelstein¹, A.V. Romanov¹, S.A. Ratchina¹, S.B. Yatsyshina², I.V. Rakovskaja³, R.S. Kozlov¹

¹Institute of Antimicrobial Chemotherapy Smolensk State Medical Academy (46a Kirova St. Smolensk 214019 Russian Federation),

²Central Research Institute for Epidemiology (3a Novogyreevskaja St. Moscow 111123 Russian Federation), ³Research Institute of Epidemiology and Microbiology named under N.F. Gamaleya (18 Gamaleya St. Moscow 123098 Russian Federation)

Background. *Mycoplasma pneumoniae* is a widespread pathogen of the respiratory tract diseases. In recent years, the data of foreign publications indicate the appearance and spread of resistant *M. pneumoniae* to macrolide antibiotics, which is associated with mutations in the 23S pRNA gene, mainly in positions 2063, 2064 and 2617.

Methods. Studied 146 clinical samples obtained in 2006–2013. of patients with infections of the lower respiratory tract. Primary screening was done for the presence of DNA material *M. pneumoniae* based on polymerase chain reaction (PCR) in real time.

Results. The possibility of detecting and differentiation of various mutations in positions 2063, 2064 and 2617 in the 23S pRNA gene format single sample multiplex PCR in real time with subsequent melting curve analysis of fluorescently-labeled probes. In the study of clinical samples in all cases been detected 23S pDNA sequences of *M. pneumoniae* “wild-type” typical for phenotype of sensitivity to macrolides.

Conclusions. Detection of single nucleotide corresponding replacements allows effective predict macrolide resistance phenotype, but used for this purpose methods are laborious and expensive. At present data on the prevalence and mechanisms of macrolide resistance in strains of *M. pneumoniae* in Russia are absent. The present study focuses on the development and validation of a new method for the determination of mutations associated with resistance to macrolides in *M. pneumoniae*, and also its use for the analysis of clinical samples in patients with lower respiratory tract infections.

Keywords: mycoplasma, molecular diagnostics, antibiotic resistance.

Pacific Medical Journal, 2015, No. 1, p. 63–66.

Mycoplasma pneumoniae вызывает заболевания респираторного тракта, и, по мнению ряда исследователей, может длительно персистировать в клетках эпителия, лимфоузлов, лимфоузлов, обуславливать более тяжелое течение неспецифических заболеваний легких и служить причиной обострения хронической бронхолегочной патологии [15]. *M. pneumoniae* также может

являться этиологическим агентом широкого спектра внелегочной патологии и постинфекционных осложнений [7].

Макролиды – антибиотики выбора для лечения заболеваний, вызванных *M. pneumoniae*. Однако публикации последних лет свидетельствуют о нарастании вторичной устойчивости к препаратам данной группы у ряда штаммов этого возбудителя [8]. В отдельных публикациях описаны случаи рецидива микоплазменной пневмонии или длительного ее течения на фоне терапии макролидными антибиотиками, известны также случаи формирования устойчивости к азитромицину *in vivo*, подтвержденные результатами определения чувствительности последовательно выделенных изолятов *M. pneumoniae* [6, 11]. Более того, в ряде стран Европы, Азии и Северной Америки зарегистрированы локальные вспышки респираторных инфекций, вызванных устойчивыми к макролидам штаммами *M. pneumoniae*, а в Китайской Народной Республике и Японии, по данным многоцентровых эпидемиологических исследований, распространенность устойчивости достигает 20 и 60 %, соответственно [9].

В настоящее время проблема формирования антибиотикорезистентности у микоплазм изучена достаточно хорошо. Продемонстрирована возможность селекции мутаций устойчивости к эритромицину, азитромицину и джозамицину у клинических штаммов при их последовательном культивировании на среде с возрастающей концентрацией препаратов, а также хорошо описаны молекулярные механизмы макролидоустойчивости *M. pneumoniae* у клинических изолятов [3]. Мутации в генах, приводящие к модификации мишени связывания с антибиотиком, описаны для различных групп препаратов. Одним из механизмов формирования резистентности к макролидным антибиотикам является наличие мутаций в генах 23S рРНК и рибосомальных белков, приводящих к конформационным изменениям пептидилтрансферазного центра и, соответственно, к снижению аффинности препаратов.

В Российской Федерации до настоящего времени исследования чувствительности *M. pneumoniae* к антибактериальным препаратам с использованием

Эйдельштейн Инна Александровна – канд. биол. наук, зав. лабораторией молекулярной диагностики НИИ антимикробной химиотерапии СмолГМА; e-mail: inna.edelstein@antibiotic.ru

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.

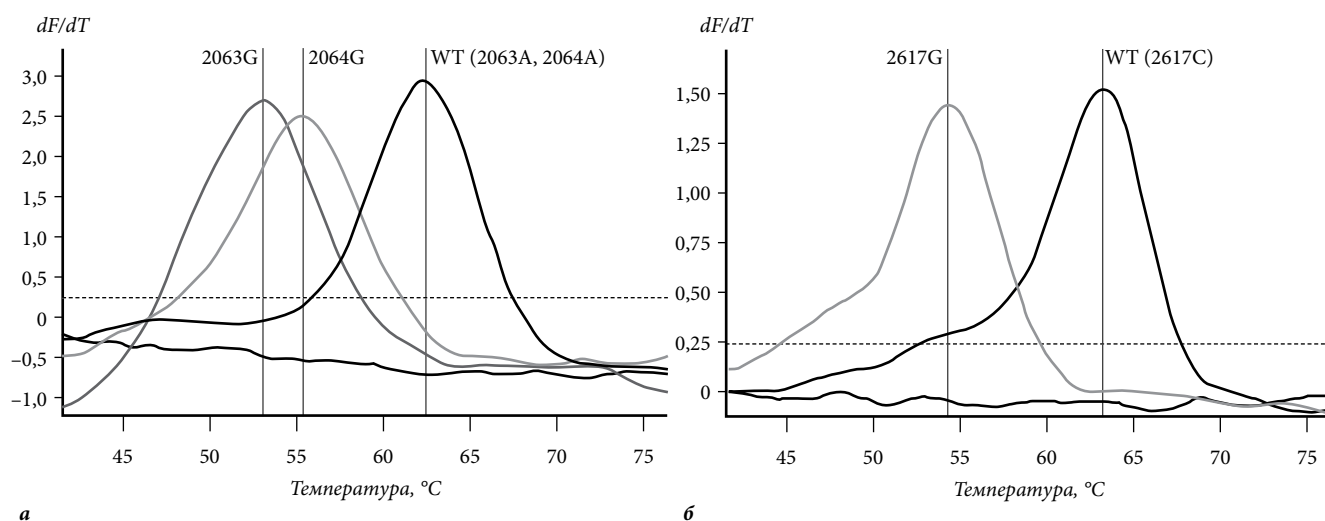


Рис. Пример одновременного выявления различных мутаций устойчивости к макролидам в гене 23S рРНК *M. pneumoniae* с помощью оценки кривых плавления флуоресцентно меченых зондов (а – FAM, б – R6G) после мультиплексной ПЦР в режиме реального времени. WT – wild type (дикий тип).

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.

Results of the study. The technology used in this study ensures the possibility of identifying various (both known and unknown) mutations in the binding region of oligonucleotide probes and is based on the effect of energy transfer of fluorescence between the probe and one of the primers [2]. For detection of mutations in two target regions of the 23S rRNA of *M. pneumoniae*, including positions 2063–2064 and 2617, two oligonucleotide probes, respectively, containing two oligonucleotide probes, containing fluorophores (FAM and R6G) at the 3'-end and fully complementary to the sequences of 23S rDNA of wild type, and two pairs of primers, in each of which one primer, forming the DNA strand, complementary to the probe, is located immediately before the binding region of the probe and contains an internal non-fluorescing (dark) quencher of fluorescence. In this way, the binding of probes with DNA strands, formed as a result of primer extension, leads to the proximity of fluorophores and quenchers at a distance, sufficient for effective quenching of fluorescence due to resonance energy transfer of fluorescence or formation of stable complexes between fluorophore and quencher (static or contact

quenching). In accordance with the described above design, mutations in the 23S rRNA regions can be identified with the help of post-amplification analysis of melting curves of probes: samples containing single nucleotide substitutions in the binding region of the probe, characterized by reduced affinity, and, correspondingly, lower melting temperature. Control samples of DNA of *M. pneumoniae*, carrying mutations A2063G and A2064G were clearly distinguishable from each other and differed from «wild type» samples by the melting temperature of the probe Mpn2063-Pb2, respectively at 9.5 and 7.3 °C (fig., a). The difference in the melting temperature of the probe Mpn2617-Pb for the mutant sample S2617G compared to the wild type sample was 8.8 °C (fig., b).

Specificity of the developed method was evaluated by studying control samples containing DNA of *Chlamydomonas pneumoniae*, *M. pneumoniae*, *Mycoplasma genitalium*, *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, and also 20 samples of human DNA, not containing DNA of *M. pneumoniae*. All samples, selected for control of specificity, were preliminarily characterized using commercial reagent kits (Russia). Positive results of amplification were obtained only for samples of DNA of *M. pneumoniae* (specificity 100%). Analytical sensitivity of the method was not less than 15 genome equivalents of *M. pneumoniae* FH ATCC 15531 in a reaction.

The developed method was used for analysis of 146 clinical samples, positive for the presence of DNA of *M. pneumoniae* by the results of primary screening with the use of commercial reagent kits «AmpliСенс *Mycoplasma pneumoniae/Chlamydomonas pneumoniae*-FL». Specific sequences of 23S rRNA were detected in 140 samples (relative sensitivity 95.8%). Screening did not detect

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.