

**ФЕДЕРАЛЬНАЯ СЛУЖБА ПО НАДЗОРУ И СФЕРЕ ЗАЩИТЫ ПРАВ
ПОТРЕБИТЕЛЕЙ И БЛАГОПОЛУЧИЯ ЧЕЛОВЕКА**

Федеральное бюджетное учреждение науки «Нижегородский научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии имени академика И.Н. Блохиной»

**«МИКРОБИОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ
МЕТОДЫ В ИССЛЕДОВАНИИ АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТИ
УРОГЕНИТАЛЬНЫХ МИКОПЛАЗМ»**

Монография

Нижний Новгород, 2025

УДК 579.61
ББК 28.4
В 60

Микробиологические и молекулярно-генетические методы в исследовании антибиотикорезистентности урогенитальных микоплазм. Монография / Колесникова Е.А., Бруснигина Н.Ф. – Нижний Новгород: Изд-во Дятловы Горы. – 156 с.

В монографии представлен метаанализ современных данных литературы и результаты собственных исследований по проблеме антибиотикорезистентности урогенитальных микоплазм, приведены данные многолетнего мониторинга их устойчивости, охарактеризованы основные молекулярные механизмы возникновения резистентности, описаны особенности структуры генома, особое внимание уделено мультилокусному типированию штаммов *Mycoplasma hominis*.

Монография предназначена для врачей-акушеров-гинекологов, специалистов клинко-диагностической службы, эпидемиологов и студентов медицинских и биологических вузов.

Рецензенты:

Каткова Н.Ю. - заведующий кафедрой акушерства и гинекологии ФДПО ФГБОУ ВО «ПИМУ» Минздрава России, д-р мед.наук, профессор.

Новикова Н.А. - ведущий научный сотрудник - заведующий лабораторией молекулярной эпидемиологии вирусных инфекций ФБУН ННИИЭМ им.академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора, д-р биологических наук, профессор.

ISBN 978-5-90522-778-3

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение.....	7
ГЛАВА 1 КЛАССИФИКАЦИЯ, РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ, КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ УРОГЕНИТАЛЬНЫХ МИКОПЛАЗМ	9
1.1 История открытия, классификация и современный взгляд на систематику микоплазм.....	9
1.2 Распространенность и клиническое значение урогенитальных микоплазм.....	11
ГЛАВА 2 БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА УРОГЕНИТАЛЬНЫХ МИКОПЛАЗМ.....	20
2.1 Морфологические, биохимические и культуральные особенности..	20
2.2 Особенности генетической организации урогенитальных микоплазм.....	22
2.3 Патогенность и вирулентность урогенитальных микоплазм.....	24
ГЛАВА 3 АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ УРОГЕНИТАЛЬНЫХ МИКОПЛАЗМ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИХ УСТОЙЧИВОСТИ.....	28
3.1. Характеристика фенотипической резистентности урогенитальных микоплазм, выделенных в период с 2006 по 2023 гг.....	30
3.1.1 Характеристика антибиотикорезистентности клинических изолятов <i>Ureaplasma spp.</i>	30
3.1.2 Фенотипическая характеристика антибиотикорезистентности клинических изолятов <i>Mycoplasma hominis</i>	38
3.2 Механизмы антибактериальной устойчивости	40
3.2.1 Механизмы резистентности к фторхинолонам.....	43
3.2.2 Механизмы резистентности к тетрациклинам и аминогликозидам	50
3.2.3 Механизмы резистентности к макролидам и линкозамидам....	51
ГЛАВА 4 ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ИНДИКАЦИИ И	53

ИДЕНТИФИКАЦИИ УРОГЕНИТАЛЬНЫХ МИКОПЛАЗМ.....	
4.1. Микробиологические методы	53
4.2 Серологические методы	54
4.3 Молекулярно–генетические методы	55
4.4 Микробиологические и молекулярно-генетические методы в исследовании антибиотикорезистентности урогенитальных микоплазм	57
4.4.1 Микробиологические методы	57
4.4.2 Молекулярно-генетические методы	58
4.4.3 Выявление tetM детерминанты резистентности	60
4.4.4 Выявление детерминант резистентности к макролидам и фторхинолонам	61
ГЛАВА 5 МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА УРОГЕНИТАЛЬНЫХ МИКОПЛАЗМ, ВЫЯВЛЕННЫХ У РЕПРОДУКТИВНОГО НАСЕЛЕНИЯ Г.НИЖНЕГО НОВГОРОДА	64
5.1 Механизмы антибиотикорезистентности урогенитальных микоплазм	67
5.1.1 Генетические детерминанты резистентности <i>M.hominis</i> и <i>Ureaplasma spp.</i> к эритромицину и тетрациклинам	67
5.1.2. Определение механизмов резистентности <i>M.hominis</i> к тетрациклинам с использованием высокопроизводительного секвенирования	69
5.1.3. Генетические детерминанты резистентности <i>M. genitalium</i> к макролидам и фторхинолонам	72
5.1.4 Характеристика молекулярных механизмов резистентности клинических изолятов <i>M.hominis</i> к фторхинолонам (гены <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> , <i>parE</i>)	75
5.1.4.1 Молекулярно-генетическая характеристика гена <i>gyrA</i>	76
5.1.4.2 Молекулярно - генетическая характеристика гена <i>gyrB</i> ...	78
5.1.4.3 Молекулярно - генетическая характеристика гена <i>parC</i> ...	80

5.1.4.4 Молекулярно - генетическая характеристика гена <i>parE</i>	83
5.1.5 Молекулярно-генетическая характеристика эффлюксных систем клинических изолятов <i>Mycoplasma hominis</i>	85
5.1.6. Характеристика молекулярных механизмов резистентности клинических изолятов <i>M.hominis</i> к макролидам	91
5.1.6.1 Генетическая характеристика 23S рРНК	91
5.1.6.2 Молекулярно - генетическая характеристика рибосомных белков L22 и L4	93
5.1.7 Характеристика молекулярных механизмов антибиотикорезистентности клинических изолятов <i>Ureaplasma ssp.</i> к препаратам фторхинолонового ряда (гены <i>gyrA</i> , <i>gyrB</i> , <i>parC</i> и <i>parE</i>)	94
5.1.7.1 Молекулярно - генетическая характеристика гена <i>gyrA</i> ...	95
5.1.7.2 Молекулярно - генетическая характеристика гена <i>gyrB</i> ...	96
5.1.7.3 Молекулярно - генетическая характеристика гена <i>parC</i> ...	97
5.1.7.4 Молекулярно - генетическая характеристика гена <i>parE</i> ...	98
5.1.8 Молекулярно-генетическая характеристика ABC системы мембранного транспорта изолятов <i>Ureaplasma spp.</i>	100
5.1.9 Характеристика молекулярных механизмов резистентности клинических изолятов <i>Ureaplasma ssp.</i> к макролидам	101
5.1.9.1 Генетическая характеристика 23S рРНК	101
5.1.9.2 Молекулярно-генетическая характеристика рибосомных белков L4 и L22	102
5.2 Расширенное мультилокусное типирование штаммов <i>Mycoplasma hominis</i>	105
5.3 Филогенетический анализ полных последовательностей генома клинических изолятов <i>M.hominis</i> , <i>U.urealyticum</i> и <i>U.parvum</i>	112
5.3.1 Филогенетический анализ генома <i>M. hominis</i>	113
5.3.2 Филогенетический анализ генома <i>U.parvum</i>	116
5.3.3 Филогенетический анализ генома <i>U.urealyticum</i>	117

ЗАКЛЮЧЕНИЕ	119
Список использованных источников.....	121
Список сокращений и обозначений.....	151
ПРИЛОЖЕНИЕ	153

ВВЕДЕНИЕ

Современной особенностью инфекционно-воспалительных процессов органов мочеполовой системы является возрастающая роль условно-патогенных микроорганизмов, треть из которых составляют бактерии родов *Mycoplasma* и *Ureaplasma* [46]. По данным литературы частота обнаружения *M.hominis* и *U.urealyticum/parvum* у населения репродуктивного возраста варьирует от 10% до 50%, увеличиваясь при урогенитальной патологии до 80%. Инфицированность пациентов *M.genitalium* при воспалительных заболеваниях мочеполовой системы составляет 11 - 41,7% [3, 7, 8, 13, 35, 43, 48, 59, 62, 63, 65, 68, 69, 78, 80, 81, 83, 91, 93, 96, 97, 110, 132, 137, 140, 149]. По мнению ряда авторов, генитальные микоплазмы могут быть причиной бесплодия у женщин и мужчин, влиять на течение и исход беременности, а также вызывать инфекционные заболевания у новорожденных [8, 11, 13, 15, 22, 25 – 27, 29, 30, 37, 39, 47, 52 – 56, 64, 68, 69, 71, 72, 76, 79, 82, 90, 92, 98, 99, 106, 123, 128, 136, 137, 140, 147, 160, 163 – 165, 178, 193, 198, 199, 201, 206, 210, 216, 217, 220, 221]. Длительная персистенция микоплазм и уреаплазм в организме, низкая антигенная нагрузка, а также эмпирический выбор антибактериального препарата с целью их элиминации способствуют частому переходу инфекции в рецидивирующее течение.

В отечественной и зарубежной литературе в последние годы публикуются данные, свидетельствующие о росте числа урогенитальных микоплазм, устойчивых к действию антибактериальных препаратов [3, 5, 9, 14, 16, 18, 27, 31, 41 – 44, 50, 51, 55, 60, 65, 74, 77, 95, 100, 104, 105, 109, 110, 112, 119, 121, 124, 126, 129, 135, 139, 140, 143, 146, 148, 155, 156, 159, 162 – 166, 169, 186, 190 – 192, 196, 205, 207]. Проблема возрастающей антибиотикорезистентности бактерий на сегодняшний день имеет огромное социально-экономическое значение и рассматривается как реальная угроза состоянию здоровья людей, глобальной и национальной безопасности [21, 36, 40, 94]. Актуальность данной проблемы подтверждается вниманием к ней органов исполнительной и законодательной власти РФ. Распоряжением

Правительства РФ от 25.09.2017г. №2045-р утверждена Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года [88]. Основными направлениями Стратегии являются: изучение механизмов возникновения резистентности, мониторинг ее распространения, повышение осведомленности населения о рациональном применении противомикробных лекарственных препаратов, поэтому исследования, направленные на мониторинг молекулярных механизмов резистентности микроорганизмов, включая урогенитальные микоплазмы, приобретают особую актуальность.

В монографии представлены современные данные отечественных и зарубежных источников литературы по проблеме антибиотикорезистентности урогенитальных микоплазм, а также результаты собственных многолетних исследований распространенности и молекулярных механизмов устойчивости нижегородских изолятов микоплазм, циркулирующих среди репродуктивного населения.

Выражаем надежду на то, что представленные в монографии метанализ современной литературы и результаты многолетних комплексных научных исследований, имеющих прямое отношение к реализации «Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности на период до 2030 года», утвержденной распоряжением Правительства Российской Федерации и направленных на сохранение репродуктивного здоровья населения, будут интересны и полезны нашим коллегам в их повседневной работе.

ГЛАВА 1 КЛАССИФИКАЦИЯ, РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ, КЛИНИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ УРОГЕНИТАЛЬНЫХ МИКОПЛАЗМ

1.1 История открытия, классификация и современный взгляд на систематику микоплазм

Открытие микоплазм произошло в конце XIX века. В 1896-1898гг. Е. Nocard и Е. Roux впервые выделили и описали представителей класса *Mollicutes* как возбудителей атипичной плевропневмонии у крупного рогатого скота. Возбудитель плевропневмонии был назван *Mycoplasma mycoides* [10, 11, 19, 38, 141, 211].

В 1935г. микоплазмы ошибочно были отнесены к L-формам бактерий, что не позволяло рассматривать их в качестве самостоятельной таксономической единицы в общей классификации микроорганизмов. И только молекулярно-генетические методы исследования, в частности, ДНК-гибридизация, доказали их самостоятельность [11, 141, 185].

С разработкой и производством искусственных питательных сред для культивирования и развитием молекулярно-генетических технологий стало возможным глубокое изучение биологических свойств и структуры генома микоплазм. Первый крупномасштабный проект по прочтению генома микоплазм был начат в 1990г. в Гарвардской геномной лаборатории. Первая информация о полной нуклеотидной последовательности генома *Mycoplasma genitalium* и *Mycoplasma pneumoniae* была получена в 1996г. Геном *Mycoplasma genitalium* является самым малым среди микоплазм и может служить естественной моделью генома «минимальной клетки» [10, 11, 19, 38, 141, 170, 182, 185, 211].

Основные принципы классификации микоплазм были сформулированы в работах Д. Эдварда и Е. Фройнда [158, 185, 199]. Классификация микоплазм изменялась по мере открытия и описания новых видов и установления их связей с таксонами класса *Mollicutes* [19, 67, 69, 122, 144, 145, 157, 158, 185, 212]. Долгое время микоплазмы классифицировали по

источнику выделения, этот принцип отражен в латинских названиях многих микоплазм, например - *Mycoplasma bovis* впервые была обнаружена у крупного рогатого скота, *Mycoplasma hominis* - у человека.

В соответствии с классификацией Bergy (1997г.), микоплазмы принадлежали к типу *Tenericutes*, классу *Mollicutes*, порядку *Mycoplasmatales*, семейству *Mycoplasmataceae*, которое включает два рода – *Mycoplasma* и *Ureaplasma*. В 2000 г. на основании данных, полученных в результате секвенирования участков 16S рНК, род *Ureaplasma* был разделен на два биовара: *urealyticum* и *parvum*. Разделение биоваров *urealyticum* и *parvum* на серовары основано на вариабельности гена *mba*. *Ureaplasma urealyticum* объединяет серотипы 2, 4, 5 и 7 – 13, *Ureaplasma parvum* - серотипы 1, 3, 6 и 14. Показано, что серовары 3 и 14, в отличие от 6 и 1 сероваров *Ureaplasma parvum*, являются высокогомологичными [19, 67, 69, 122, 144, 145, 157, 158, 185, 199, 212].

В 2018г. коллектив ученых из Канады и Израиля [144] опубликовал статью, в которой представлены новые номенклатурные названия порядка, семейства и рода микоплазм. Так, *Mycoplasma genitalium* переименована в *Mycoplasmoides genitalium*, *Mycoplasma hominis* в *Metamycoplasma hominis*, *Mycoplasma pneumoniae* в *Mycoplasmoides pneumoniae*, *Mycoplasma agalactiae* в *Mycoplasmopsis agalactiae*, *Mycoplasma bovis* в *Mycoplasmopsis bovis*.

Международный комитет по систематике прокариот (ICSP), рассмотрев предложение Gupta et al. [111], пришел к заключению, что предлагаемые номенклатурные изменения являются не нужными, граничащими с «номенклатурным вандализмом». По мнению членов комитета, предложенная номенклатура вряд ли будет принята научным сообществом и специалистами в области медицины и сельского хозяйства.

Тем не менее, в настоящее время в международной базе данных NCBI (правильное название) наименования таксонов ранее зарегистрированных геномов микоплазм изменены на новые названия, предложенные Gupta et al. [144, 145]. Следует отметить, что первоначальные названия видов микоплазм

сохранят свое положение в номенклатуре и, по-прежнему, могут использоваться в медицинской и ветеринарной практике на равных правах с вновь предложенными [111].

Однако, по мнению членов Международного комитета по систематике прокариот, многочисленные изменения и многообразие наименований таксонов микоплазм приведут к путанице и дестабилизации таксономии микоплазм [111].

Таким образом, в научном сообществе существуют противоречивые мнения о целесообразности внесения номенклатурных изменений в названия таксонов. Предлагаемая Gupta et al. [144, 145] схема основана на анализе единичных генетических полиморфизмов без учета высокой вариабельности генома микоплазм, поэтому потребуются частые номенклатурные поправки, что приведет к путанице и дестабилизации общепринятой классификации микоплазм, имеющей важное значение как для фундаментальной, так и практической микробиологии, и эпидемиологии.

1.2 Распространенность и клиническое значение урогенитальных микоплазм

Биологические особенности уреоплазм и микоплазм, такие как малый размера генома, ограниченность метаболических путей, высокая скорость фенотипической и генетической изменчивости, отсутствие клеточной стенки, способность к персистенции на мембране клеток организма хозяина, слабая иммуногенность определяют сложность их идентификации. В то же время стрессовый прессинг и ослабление иммунитета населения способствуют возрастанию значимости данных микроорганизмов в развитии инфекционно-воспалительных заболеваний органов урогенитального тракта [10, 11, 19, 38, 141].

Согласно современным данным литературы, микоплазмы обнаруживаются у 40% больных урогенитальными инфекциями. Клиническое значение имеют следующие виды: *Mycoplasma genitalium*,

Mycoplasma hominis, *Ureaplasma urealyticum*, *Ureaplasma parvum* [3, 5, 9, 14, 16, 18, 27, 31, 41 – 44, 50, 51, 55, 60, 65, 74, 77, 95, 100, 104, 105, 109, 110, 112, 119, 121, 124, 126, 129, 135, 139, 140, 143, 146, 148, 155, 156, 159, 162 – 166, 169, 186, 190 – 192, 196, 205, 207].

M.genitalium, как свидетельствуют многочисленные клинические и экспериментальные исследования, является патогенным микроорганизмом, способным вызывать цервицит у женщин и уретрит у лиц обоего пола [7, 8, 66, 97, 99, 106, 123, 131, 167, 179, 194, 198, 201, 209]. Частота обнаружения *M. genitalium* при негонококковых уретритах варьирует от 11,5 до 41,7%, при негонококковых нехламидийных уретритах – от 3 до 54,5%. В литературе существуют доказательства этиологической роли *M.genitalium* в развитии урогенитальных инфекций у женщин, в том числе сальпингита, трубного бесплодия, острого эндометрита. У 7 - 10% женщин с признаками ВЗОМТ в клинических образцах эндометрия и эпителия шейки матки выделяются *M.genitalium* [7, 8]. Распространенность *M.genitalium* у клинически здоровых лиц составляет 0,7-6% [66, 194].

Вопрос о клинической значимости *M.hominis*, *U.urealyticum*, и *U.parvum* широко обсуждается в научно-медицинской литературе и до сих пор остается нерешенным. Большинство исследователей оценивают их как представителей микробиома урогенитального тракта, которые при определенных условиях могут реализовать свой патогенный потенциал и вызвать воспалительный процесс в органах малого таза [7, 16, 61 – 63, 67, 68, 79]. Имеются многочисленные данные литературы о выделении урогенитальных микоплазм у мужчин при уретрите, простатите, эпидидимите, везикулите, баланопостите; а у женщин – при вагините, цервиците уретрите, заболеваниях шейки матки, сальпингоофорите эндометрите, нарушениях репродуктивной функции (преждевременных родах, мертворождениях, самопроизвольных выкидышах). Бесплодие у женщин и мужчин часто связывают с воспалительными заболеваниями мочеполовой системы, ассоциированной с урогенитальными микоплазмами

[8, 11, 13, 15, 22, 25 – 27, 29, 30, 37, 39, 47, 52 – 56, 64, 68, 69, 71, 72, 79, 82, 90, 92, 98, 99, 106, 123, 128, 136, 137, 140, 147, 160, 163 – 165, 178, 193, 198, 199, 201, 206, 210, 216, 217, 220, 221]. Ряд авторов придерживается противоположного мнения, считая, что микоплазмы и уреаплазмы не оказывают неблагоприятного воздействия на мочеполовую систему макроорганизма, ссылаясь на выявление *M.hominis* и *Ureaplasma* у клинически здоровых женщин и рассматривают их как представителей флороценоза в норме [16, 17, 76].

В классификации ВОЗ (2006г.) и CDC (Centers for Disease Control and Prevention, USA) *M.hominis* и *Ureaplasma spp.* рассматриваются как вероятные этиологические агенты неспецифических негемококковых уретритов, бактериального вагиноза и различных воспалительных заболеваний органов малого таза [72].

Урогенитальные инфекционные заболевания, вызванные генитальными микоплазмами, согласно Международной классификации болезней и причин смерти X-го пересмотра (МКБ-Х, 2010г.) подразделяются на:

A49.3 – инфекция, вызванная микоплазмой, неуточненная (уретрит, ассоциированный с генитальными микоплазмами; цервицит, ассоциированный с генитальными микоплазмами);

N34.0+B96.8 уретрит, вызванный уточненным бактериальным агентом (*M.genitalium* и/или *U.urealyticum* и/или *M.hominis*);

N76.0+B96.8 вагинит, вызванный уточненным бактериальным агентом (*M.genitalium* и/или *U.urealyticum* и/или *M.hominis*);

N72.0+B96.8 цервицит, вызванный уточненным бактериальным агентом (*M.genitalium* и/или *U.urealyticum* и/или *M.hominis*).

Следует отметить, что инфекции, ассоциированные с урогенитальными микоплазмами, не являются официально регистрируемыми, поэтому знания об уровне истинного распространения данных возбудителей отсутствуют [18, 23, 29].

Распространенность урогенитальных микоплазм зависит от социально-экономического статуса обследуемого контингента. Частота выявления урогенитальных микоплазм у социальноблагополучных женщин составляет 43,7%, у неблагополучных – 86,9%. Частота их обнаружения у здоровых лиц варьирует от 15 до 20%, а у лиц с заболеваниями урогенитального тракта она достигает 80% [48, 79].

Показатели распространенности инфекций, обусловленных урогенитальными микоплазмами, в разных странах мира варьируют от 3 до 80% (таблица 1). Следует отметить, что подавляющее количество исследований основано на анализе небольших групп пациентов и, как правило, носит ретроспективный характер.

Таблица 1 - Распространенность урогенитальных микоплазм в разных странах мира

Страна	Частота выявления (%)	Источник
Япония	8,5-42% <i>Ureaplasma spp.</i> 12% - <i>M. hominis</i> 18% - <i>M. genitalium</i>	154
Польша	29,8% <i>Ureaplasma spp.</i> 3,7% <i>M. hominis</i> 6,7% - <i>M. genitalium</i> При воспалительных заболеваниях УГТ	136
Куба	68.9% - <i>U. urealyticum</i> 4.3% - <i>M. hominis</i> в качестве единственных возбудителей инфекционного процесса	163
Италия	33,3% - <i>U. urealyticum</i> 0,9% - <i>M. hominis</i>	164
Судан	6,9% - <i>U. urealyticum</i> 13,8% - <i>M. hominis</i>	213
США	32% - <i>M. genitalium</i> при НГУ 4-11% - <i>U. urealyticum</i> 37-72% - <i>U. parvum</i> 3-34 % - <i>M. hominis</i> 0,6-4% - <i>M. genitalium</i>	158 205
Франция	10-24% - <i>M. genitalium</i> при НГУ	129

Страна	Частота выявления (%)	Источник
Великобритания	12 – 27% - <i>M. genitalium</i> при НГУ	196
Африка	82,2% - <i>U. urealyticum</i> 1,6% - <i>M. hominis</i>	154
Китай	75,8% - <i>U. urealyticum</i> 6,48% - <i>M. hominis</i>	166, 217
Россия	41,7% - <i>U. urealyticum</i> 6,9% - <i>M. hominis</i> 1,3% - <i>M. genitalium</i>	41 – 45, 105, 126, 135, 192

По мнению ряда авторов, трудность диагностики инфекций, ассоциированных с микоплазмами и уреаплазмами, распространенность урогенитальных микоплазм и неадекватность проводимой терапии привели к доминированию этих инфекций среди воспалительных заболеваний мочеполовой системы человека [16, 23, 32, 70, 71, 78, 81, 91].

Результаты многолетних исследований распространенности урогенитальных микоплазм у репродуктивного населения г. Нижнего Новгорода, проведенных сотрудниками лаборатории метагеномики и молекулярной индикации патогенов ФБУН ННИЭМ в рамках выполнения НИР «Омиксные технологии в мониторинге лекарственной устойчивости возбудителей актуальных инфекций» согласно Отраслевой научно-исследовательской программы. «Научное обеспечение эпидемиологического надзора и санитарной охраны территории Российской Федерации. Создание новых технологий, средств и методов контроля и профилактики инфекционных и паразитарных болезней» (на 2021-2025гг.) также свидетельствуют о широком распространении *Ureaplasma spp.* в клинически значимых титрах ($10^4 \geq \text{КОЕ}$) у мужчин ($29 \pm 0,9\%$) и женщин ($54,1 \pm 0,3\%$) с заболеваниями УГТ, так и в группах сравнения ($18,7 \pm 0,5\%$ мужчин и женщин $28,3 \pm 0,3\%$). Частота выявления *Ureaplasma spp.* ($10^4 \geq \text{КОЕ}$) у женщин была достоверно выше, чем у мужчин и составляла $41,7 \pm 0,3\%$ и $24 \pm 0,9\%$ соответственно. Инфицированность женщин и мужчин *M. genitalium* практически не отличалась, и составляла в среднем $1,2 \pm 0,05\%$ и $1,4 \pm 0,01\%$

соответственно. Показатели частоты обнаружения *M.hominis*, *M. genitalium* и *Ureaplasma spp.* в разных обследуемых группах представлены в таблице 2.

Таблица 2 – Частота выявления клинических изолятов *M.hominis*, *M. genitalium* и *Ureaplasma spp.* в обследуемых группах женщин и мужчин

Обследуемые группы	Частота выявления, %		
	<i>Ureaplasma spp.</i>	<i>M. hominis</i>	<i>M. genitalium</i>
Беременные с ОАГА (n=640)	65,3±1,8*	10,2±1,2*	0,6±0,3
Женщины с ВЗОМТ (n=1574)	68,2±1,1*	11,2±0,8*	1,6±0,3
Женщины с нарушениями функции репродукции (n=2160)	42±1,0*	8,7±0,6	1,0±0,2
Женщины, не имеющие жалоб (n=20867)	28,3±0,3	7,5±1,2	0,4±0,01
Мужчины с заболеваниями УГТ (n=415)	30,5±2,2*	12,3±1,3*	1,9±0,6
Мужчины с нарушениями функции репродукции (n=530)	20,1±1,7	7,2±1,1	1,5±0,5
Мужчины, не имеющие жалоб (n=1274)	18,7±1,1	5,6±0,6	0,6±0,2

Примечание: * данные, достоверно различающиеся с группой сравнения, $p < 0,01$.

Частота обнаружения *Ureaplasma spp.* у беременных женщин с ОАГА (65,3±1,8%), женщин с ВЗОМТ (68,2±1,1%), а также у женщин с нарушениями репродуктивной функции (42±1,0%), что согласуется с результатами, полученными другими исследователями [7, 8, 31, 41, 47, 56, 80, 81, 92, 103, 115, 128, 177].

Частота выявления *M. hominis* во всех обследуемых группах была гораздо ниже, чем уреаплазм, и составляла 10,2±1,2% у беременных женщин, 11,2±0,8% у женщин с ВЗОМТ и 8,7±0,6% у женщин с нарушением репродуктивной функции.

M.hominis и *Ureaplasma spp.* достоверно чаще выявлялись в клинически значимых титрах ($10^4 \geq \text{КОЕ}$) у беременных женщин с ОАГА, женщин и мужчин, имеющих воспалительные заболевания УГТ и нарушения репродуктивной функции, чем в группах мужчин и женщин, не имеющих жалоб на момент обращения в лечебные учреждения г. Нижнего Новгорода.

Особого внимания заслуживают результаты выявления урогенитальных микоплазм у женщин и мужчин с разными формами патологии органов мочеполовой системы, которые представлены в таблицах 3 и 4.

Таблица 3 – Распространение урогенитальных микоплазм у мужчин репродуктивного возраста с воспалительными заболеваниями органов мочеполовой системы

Заболевание	Частота выявления урогенитальных микоплазм в %		
	<i>Ureaplasma spp.</i>	<i>M.hominis</i>	<i>M.genitalium</i>
Уретрит (n=228)	41,7±3,2*	21,5±2,7*	1,1±0,7
Простатит (n=187)	33,7±3,4*	11,2±2,3*	0,8±0,6
Гр.сравнения (n=1274)	18,7±1,1	5,6±0,6	0,6±0,2

Примечание: * данные, достоверно различающиеся с группой сравнения, $p < 0,01$.

Таблица 4 – Распространение урогенитальных микоплазм у женщин репродуктивного возраста с воспалительными заболеваниями органов мочеполовой системы

Заболевание	Частота выявления урогенитальных микоплазм в %		
	<i>Ureaplasma spp.</i>	<i>M.hominis</i>	<i>M.genitalium</i>
Вагинит (n=170)	68,2±3,6*	27,6±3,4*	0,6±0,5
Кольпит (n=312)	68±2,6*	40,7±2,8*	0,8±0,5
Цервицит (n=211)	56,2±3,4*	25,3±3,0*	1,4±0,8
Эрозия шейки матки (n=296)	63,8±2,8*	36±2,8*	0,5±0,4
Аднексит (n=307)	61,3±2,8*	26,8±2,5*	0,8±0,5
Сальпингит (n=129)	61±4,3*	22,8±3,7*	0,9±0,7
Эндометриит (n=149)	51,7±4,1*	31,3±3,8*	0,6±0,6
Гр.сравнения (n=20867)	28,3±0,3	7,5±1,2	0,4±0,01

Примечание: * данные, достоверно различающиеся с группой сравнения, $p < 0,01$.

Как видно из данных, представленных в таблице, у женщин и мужчин при всех формах воспалительных заболеваний органов урогенитального тракта различной локализации наблюдается высокая частота выявления урогенитальных микоплазм. Наиболее ярко это выражено при кольпите, вагините и эрозии шейки матки у женщин, уретрите у мужчин, что говорит о значении *Ureaplasma spp.* и *M.hominis* в формировании данной патологии. Частота обнаружения изолятов *M.genitalium* была низкой, что связано с социально—благополучным статусом обследуемых. Достоверных отличий показателей в группах с различными нозологическими формами воспалительных заболеваний урогенитального тракта и группе сравнения не выявлено.

Частота выявления урогенитальных микоплазм в клинически значимом титре ($10^4 > \text{КОЕ/мл}$) у женщин с отягощенным акушерско-гинекологическим анамнезом (ОАГА) также была высокой и варьировала от 55,7% до 69,2% в зависимости от формы ОАГА (таблица 5).

Таблица 5 – Частота выявления урогенитальных микоплазм у женщин с нарушениями репродуктивной функции

Форма ОАГА	Частота выявления урогенитальных микоплазм в %		
	<i>Ureaplasma spp.</i>	<i>M.hominis</i>	<i>M.genitalium</i>
Бесплодие первичное (n=163)	69,2±3,6*	36,0±3,7*	0,8±0,7
Бесплодие вторичное (n=145)	63,1±4,0*	32,9±3,9*	0,6±0,6
Невынашивание (n=235)	55,7±3,2*	22,8±2,7*	0,5±0,4
Гр. Сравнения (n=20867)	28,3±0,3	7,5±1,2	0,4±0,01

Примечание: * данные, достоверно различающиеся с группой сравнения, $p < 0,01$.

У женщин с патологией репродуктивных органов, в частности, при первичном и вторичном бесплодии частота обнаружения *Ureaplasma spp.* и *M.hominis*, достоверно ($p < 0,01$) выше, чем в группе сравнения.

Изоляты *M.genitalium* обнаруживались существенно реже, чем другие представители урогенитальных микоплазм, как у женщин и мужчин с различными формами патологии, так и в группах сравнения, что согласуется с данными литературы [8, 11, 16, 26, 30, 47, 50, 84].

Следует отметить, что *Ureaplasma spp.* выявлялись преимущественно в виде моноинфекций, а *M.hominis* чаще в ассоциациях с уреаплазмами (в 14,3% у женщин и в 6,7% у мужчин).

ГЛАВА 2 БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА УРОГЕНИТАЛЬНЫХ МИКОПЛАЗМ

2.1 Морфологические, биохимические и культуральные особенности

Урогенитальные микоплазмы (бактерии родов *Mycoplasma* и *Ureaplasma*) относятся к группе трудно культивируемых микроорганизмов, ассоциированных с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта. Характерной чертой, присущей всем представителям класса Mollicutes, является отсутствие клеточной стенки. В отличие от L-фазовых вариантов бактерий микоплазмы не синтезируют биохимических предшественников пептидогликана [10, 11, 19, 36, 38, 73, 101, 172].

Для представителей родов *Mycoplasma* и *Ureaplasma* характерен значительный полиморфизм клеток, они могут быть сферической, палочковидной, гантелеобразной, а также различной формы, соединенные друг с другом тонкими трубочками. Микоплазмы имеют трехслойную цитоплазматическую мембрану, состоящую из белков, липидов и углеводов. Известно, что мембранные белки в зависимости от их взаимодействия с липидным бислоем разделены на две группы – интегральные и периферические. Пептидные цепи интегральных белков пересекают гидрофобную липидную основу от одного до нескольких раз. Периферические белки являются растворимыми и связаны с поверхностью мембран за счет электростатических взаимодействий. Липиды микоплазм подразделяются на фосфолипиды, гликолипиды и нейтральные липиды. Все они локализованы на плазматической мембране. Еще одним характерным признаком этих бактерий является их способность к персистенции на мембране клеток хозяина [61, 67 – 69, 158, 161, 182, 212].

Микоплазмы и уреплазмы обладают собственными системами репликации ДНК, транскрипции и биосинтеза белка, но некоторые метаболические пути у них отсутствуют или представлены нефункциональными элементами. Отсутствие у микоплазм и уреаплазм первичной способности синтезировать жирные кислоты, а также

аминокислоты, пурины и пиримидины компенсируется наличием различных ферментов, главным образом, ферментов деградации (нуклеазы и протеазы). Известно, что уреоплазмы обладают системой уреаз, с помощью которой они способны извлекать необходимые для жизнедеятельности соединения из клеток высших эукариот [10, 11, 19, 73, 182].

Микоплазмы являются факультативными анаэробами и при их культивировании иногда применяют газовую смесь (95% N₂ + 5% CO₂). Питательные среды для культивирования микоплазм могут быть полужидкими, жидкими или плотными, они содержат гидролизаты мяса, казеина, ферментативный пептон, дрожжевой экстракт, сыворотку крови лошадей, основной субстрат глюкозу, аргинин, мочевины, селективные антибиотики, индикатор pH (бромтимоловый синий или феноловый красный). Оптимальной температурой для роста микоплазм является 36,5 – 37°C, pH – 7,0. На поверхности плотной среды через 48-72 часа инкубации урогенитальные микоплазмы образуют мелкие сферические колонии. Их трудно увидеть невооруженным глазом, посеvy просматривают при малом увеличении микроскопа. При этом микоплазмы образуют более крупные колонии (0,5 мм), чем уреоплазмы (15-60 мкм). На полужидких средах микоплазмы растут по ходу посева уколом, формируя колонии, имеющие вид беловатых полупрозрачных комочков, а на жидких питательных средах растущие культуры микоплазм вызывают легкую опалесценцию [10].

Штаммы микоплазм, сбраживающие глюкозу, хорошо растут при показателях pH среды 8,0-8,5, гидролизующие аргинин или мочевины при pH – 6,5 [182]. Однако при гидролизе аргинина и мочевины вырабатывается большое количество аммиака, что приводит к защелачиванию среды и гибели клеток [10].

Выращивание микоплазм на бесклеточных средах часто приводит к потере ряда их свойств, в том числе подвижности и патогенности, но после нескольких пассажей утраченные свойства восстанавливаются. В этой связи

особое значение приобретает понимание условности патогенных свойств микоплазм.

2.2 Особенности генетической организации урогенитальных микоплазм

Геном урогенитальных микоплазм представлен двухцепочечной кольцевой ДНК. Характеристика генома дана в таблице 6.

Таблица 6 - Характеристика генома *M.genitalium*, *M.hominis*, *Ureaplasma spp.*

Наименование штамма	Размер генома, т.п.о.	Содержание Г+Ц в ДНК в %	Год расшифровки последовательности ДНК
<i>M.genitalium</i>	580	31,7	1995г.
<i>M.hominis</i>	665	27,1	2009г.
<i>Ureaplasma spp.</i>	751	25,5	2000г.

Геном *M.genitalium* составляет 580 т.п.о., и впервые был секвенирован С. Fraser с соавторами в 1995г. Второе место среди молликут по размеру генома занимает *M.hominis* (размер генома 665т.п.о.). Геном уреаплазм был полностью изучен в 2000г. (размер генома 750 т.п.о.). На основе полученных данных о полной нуклеотидной последовательности генома микоплазм и уреаплазм были расшифрованы молекулярные механизмы функционирования прокариотической клетки, содержащей минимальный набор генов. Молликуты, имея рациональную структуру генома, характеризуются полной зависимостью от внешних источников питательных веществ и адаптацией к паразитическому образу жизни [10, 11, 19, 38, 141, 170, 182, 185, 211].

Отличительной особенностью урогенитальных микоплазм является низкое содержание нуклеотидных оснований Г+Ц в составе молекул ДНК (23-41%). Это, с одной стороны, определяет ограниченность их способности к биосинтезу и требовательность к условиям культивирования, а, с другой – не мешает процессу кодирования белков с нормальным аминокислотным

составом. Среди представителей молликут состав Г+Ц оснований в геноме варьирует у *M. genitalium* - 31,7%, *M. hominis* – 27,1%, *Ureaplasma spp.* - 25,5% [10, 11, 19, 73].

В настоящее время исследования, направленные на изучение функциональных особенностей генов, необходимых для поддержания жизни клетки, вызывают особый научный интерес [11, 141, 170, 182].

Большинство генов микоплазм кодируют белки, связанные с катаболизмом и транспортом метаболитов, что обуславливает ограниченность метаболических путей и зависимость от поступления питательных веществ из внешней среды. Поскольку микоплазмы не обладают способностью первично синтезировать пиримидины и пурины, то для осуществления процессов жизнедеятельности и деления клетки им необходима транспортировка предшественников нуклеиновых кислот из внешней среды. Генетический код у большинства микоплазм отличается от универсального, а именно: триплет нуклеотидов TGA кодирует триптофан и не является стоп-кодоном [10, 11, 19, 38, 141, 170, 182, 185, 211].

По мнению ряда исследователей, пластичность и высокие адаптивные свойства генома микоплазм связаны с высокой частотой мутаций по сравнению с другими видами бактерий [10, 11, 73, 100, 141, 185]. Показано, что размер генома микоплазм может изменяться как в пределах рода, вида, так и штамма, что обуславливает высокую изменчивость их фенотипических и генетических свойств [25, 28].

Несмотря на малые размеры генома, ДНК микоплазм содержит до 10% повторяющихся последовательностей, которые связаны с генами, детерминирующими основные поверхностные антигены возбудителей. Отмечено, что копии каждой повторяющейся единицы гена являются высокогомологичными, но не идентичными [11]. В 2006 г. J. Glass с соавт. в геноме *M. genitalium* выделил 382 из 482 основных белоккодирующих генов. R. Zhang и Y. Lin в 2009г. показали, что для обеспечения жизнедеятельности *M.genitalium* необходим всего 381 ген. D. Taylor-Robinson (1995), H. Su и

соавт. (2007) при изучении открытых рамок считывания (ORF) определили 480 ORF и 37 генов, кодирующих РНК [141, 170, 199, 220]. По данным Р. Уено и соавт. (2008г.) геном *M.genitalium* содержит 484 кодирующие области [201].

Американские ученые J. Glass и соавт., показали, что геном *Ureaplasma spp.* содержит 613ORF и 39 генов, кодирующих РНК [141].

Показано, что в геноме *M.hominis* содержится 537 белоккодирующих генов, 247 из них являются общими для видов *M.genitalium*, *M.hominis*, *Ureaplasma spp.* и отвечают за выполнение клеточных функций (синтез белка, нуклеотидов, метаболизм ДНК, транспортировка и связывание с субстратами, метаболизм жирных кислот и фосфолипидов). Установлено, что 172 гена *M.genitalium*, 220 генов *M.hominis* и 280 генов *Ureaplasma spp.* являются уникальными и видоспецифичными. Наличие общих генов у представителей класса молликут вероятно связано с их горизонтальным переносом [11, 19, 73, 141, 170].

В составе генома микоплазм и уреаплазм обнаружены подвижные элементы: транспозоны (TN) и инсерционные элементы (IS), которые могут участвовать в горизонтальном переносе генов между разными, часто филогенетически неродственными, бактериями [20, 85 – 87, 127].

2.3 Патогенность и вирулентность урогенитальных микоплазм

До настоящего времени не определены механизмы и условия реализации патогенности микоплазм и уреаплазм. Поскольку *M.hominis* и *Ureaplasma spp.* относятся к условно-патогенным микроорганизмам, то об их этиологической роли можно судить лишь по результатам количественного определения титра возбудителя. При этом ряд исследователей считает, что решающая роль в развитии воспалительного заболевания принадлежит неким «условиям», подразумевая, что все штаммы урогенитальных микоплазм обладают одинаковым потенциалом патогенности [7, 16, 79, 93].

В работе Барановой Н.Б. (2010 г.) было показано, что каждый человек обладает индивидуальной восприимчивостью к *M.hominis*, связанной с присутствием определенных генов ключевых иммуномедиаторов про- и противовоспалительных реакций – IL-1, IL-10 [4].

Урогенитальные микоплазмы называются «мембранными паразитами», так как основным местом их локализации являются различные, в том числе и ядерные, мембраны. Этот феномен может быть определяющим в пусковых механизмах патогенеза заболеваний, ассоциированных с урогенитальными микоплазмами. Контакт бактерий с клетками макроорганизма в точке адгезии настолько плотный, что происходит прямой обмен не только низкомолекулярными метаболитами, но и макромолекулами белков и нуклеиновых кислот. Персистенция микоплазм на мембранах клеток эукариот приводит к мимикрии их антигенов, а также к непосредственным биохимическим эффектам, вызывающим местное повреждение. Неспецифический патогенный эффект микоплазм и уреаплазм связывают с выработкой больших количеств перекиси водорода и аммиака, что обуславливает токсическое действие на клетку [10, 11, 19, 73, 141]. У некоторых видов микоплазм обнаружена способность к гемолизу эритроцитов человека и животных. Гемолитической активностью обладают липиды, белки и перекиси [11]. Персистенция урогенитальных микоплазм на мембранах эпителиальных клеток обуславливает их резистентность к действию биологических жидкостей. Микоплазмы и уреаплазмы часто локализуются в криптах мембран, что обеспечивает их недоступность для фагоцитов, поэтому в большинстве случаев микоплазмы и уреаплазмы либо не фагоцитируются, либо фагоцитоз оказывается неэффективным [73, 170].

Многие представители класса *Mollicutes* обладают фосфолипазами C, A1, A2, способными к гидролизу фосфолипидов в мембранах клеток плаценты. Это приводит к увеличению свободной арахидоновой кислоты и активизирует синтез простагландинов, что у инфицированных урогенитальными микоплазмами женщин приводит к преждевременным

родам, спонтанным абортам, мертворождению, патологии плода [11, 30, 37, 54 – 56, 59, 64, 82, 98].

Среди наиболее изученных факторов патогенности урогенитальных микоплазм являются адгезины, которые характеризуются чрезвычайно высоким уровнем антигенной изменчивости [11, 61, 67 – 69, 100, 101, 128, 167, 168].

В настоящее время доказано, что гены, детерминирующие синтез поверхностных белков, являются главными в патогенезе, хронизации инфекционного процесса и уклонении от иммунного ответа, поэтому внимание многих ученых приковано к изучению их структуры. В таблице 7 представлены основные гены, кодирующие поверхностные белки, *M.genitalium*, *M.hominis* и *Ureaplasma spp.*

Таблица 7 -Гены, кодирующие поверхностные белки, клинических изолятов *M.genitalium*, *M.hominis* и *Ureaplasma spp.*

Наименование изолята	Наименование гена	Наименование белка
<i>M. hominis</i>	vaa, P120`, P120, P60, P80	Vaa
<i>M. genitalium</i>	mgpB (MG191) mgpC (MG192)	P140 P110 (P114)
<i>Ureaplasma spp.</i>	Mba	МВА

У *M.genitalium* описаны гены *mgpB* и *mgpC*, детерминирующие синтез адгезинов. Показано, что гены *mgpC* и *mgpB* входят в состав оперона *MgPa*. Ген *mgpB* кодирует поверхностный белок P140, *mgpC* - P110. Большинство ученых считают, что неполные копии генов *mgpB* и *mgpC* обеспечивают генетическое разнообразие поверхностных белков [11, 167, 168].

Патогенный потенциал *M.hominis* обусловлен комплексом консервативных и вариабельных мембранных белков, среди которых наиболее изученными являются *VAA*, *p120`*, *P120*, *P80*, *P60*.

Высоковариабельный ген *vaa* (*variable adherence-associated*) детерминирует процесс адгезии *M.hominis* к клеткам хозяина. Изучено пять наиболее важных типов гена *vaa*, которые обладают уникальным набором генных модулей, определяющих их первичную структуру. Среди восьми изученных вариантов модулей два являются постоянными. Интересно отметить, что белки *VAA*, выделенные от одного пациента в разное время могут отличаться друг от друга [11, 69, 128]. По данным, полученным Барановой Н. Б. в 2010г., вариабельность гена *vaa* достигается за счет механизмов ДНК – трансформации, установлены случаи обнаружения изолятов *M. hominis* с версиями *vaa* гена, объединяющих модульные составы разных этногеографических групп [4].

Ген *mba* (*multiple-banded antigen*), обнаруженный в геноме уреоплазм, кодирует синтез белка *MBA*, который определяет антигенную изменчивость и патогенность бактерии. Ген *mba* состоит из консервативного 5'-отрезка и переменной 3'-области. Число повторяющихся звеньев в структуре переменной области определяет разнообразие белка *MBA* [69, 128].

Нестабильность генома урогенитальных микоплазм приводит к высокой скорости фенотипической изменчивости и определяет существование антигенного многообразия адгезинов и штаммов урогенитальных микоплазм одного и того же вида [4, 22, 49]. Высокая генетическая вариабельность урогенитальных микоплазм играет иницирующую роль в развитии воспалительного процесса в органах мочеполовой системы человека [4, 11, 25, 101, 161].

ГЛАВА 3 АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ УРОГЕНИТАЛЬНЫХ МИКОПЛАЗМ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ИХ УСТОЙЧИВОСТИ

В разных странах мира, в настоящее время регистрируется высокий уровень распространенности урогенитальных микоплазм, устойчивых к широкому спектру АБП (тетрациклины, макролиды, фторхинолоны), применяемых при терапии урогенитальных инфекций (Таблица 8). При этом отечественные и зарубежные авторы отмечают появление и распространение полирезистентных штаммов урогенитальных микоплазм [3, 5, 9, 14, 16, 18, 27, 31, 41 – 44, 50, 51, 55, 60, 65, 74, 77, 95, 100, 104, 105, 109, 110, 112, 119, 121, 124, 126, 129, 135, 139, 140, 143, 146, 148, 155, 156, 159, 162 – 166, 169, 186, 190 – 192, 196, 205, 207].

Таблица 8 - Частота распространенности резистентных форм *M. hominis* и *Ureaplasma spp.* в разных странах

Страна	Частота выявления <i>M.hominis</i> , устойчивых к (%)	Частота выявления <i>Ureaplasma spp.</i> устойчивых к (%)	Источник
Эстония	60%-офлоксацину 40%-ципрофлоксацину	92,6%- офлоксацину 85,2%-ципрофлоксацину 22,2%-азитромицину 22,2%-эритромицину	192
Сербия	33,3% - фторхинолонам 100%- эритромицину, тетрациклину, кларитромицину	86,5%-тетрациклину 83,8%-ципрофлоксацину 83,8%- эритромицину	193
Австралия	87,6%- ципрофлоксацину 23,7%- офлоксацину 26,5%-джозамицину	94,7%- ципрофлоксацину 80,9%- офлоксацину 5,9%- тетрациклину	179
Иран	70%- ципрофлоксацину 60%- офлоксацину 40%- тетрациклину 40%- эритромицину	78,1%- ципрофлоксацину 62,5%- офлоксацину 56,2%- эритромицину 50%- тетрациклину	109

Страна	Частота выявления <i>M.hominis</i> , устойчивых к (%)	Частота выявления <i>Ureaplasma spp.</i> устойчивых к (%)	Источник
Швеция	97%- эритромицину 73%- тетрациклину	80%-ципрофлоксацину 27%- тетрациклину	190
Бразилия	94%- эритромицину 70%- офлоксацину 58%- тетрациклину	46,1%- эритромицину 64,3%- офлоксацину 31,2%- тетрациклину 30,5%-азитромицину	171
Румыния	77,3%- ципрофлоксацину 27,8%- офлоксацину 38,9%- азитромицину 33,3%- эритромицину и klarитромицину	51,3%-ципрофлоксацину 16,1%- эритромицину 16,1%-klarитромицину 9,1%- азитромицину	169
Россия	41% - ципрофлоксацину 27% - мидекамицину 20,7% - клиндамицину 20,2% - джозамицин 19,7% - офлоксацину	80-83,7% - ципрофлоксацину 50-60% - офлоксацину 27% - азитромицину 26% - эритромицину 9,8% - рокситромицину 2-4%- klarитромицину	6, 41 – 45, 100, 105,

Исследования антибиотикорезистентности *M. genitalium*, выделенных в разных странах, показали широкое распространение макролид-резистентных штаммов. В Европейских странах доля устойчивых к макролидам *M. genitalium* составляет 5,0% - 25,0%; в Австралии – 36,0% – 43,0%; в Японии – 29,0% – 47,0%; в США - 48 % [121, 139, 168, 169, 171, 179, 190, 193].

В условиях широкой циркуляции антибиотикорезистентных штаммов урогенитальных микоплазм проблема мониторинга их антибиотикорезистентности приобретает особую актуальность.

3.1. Характеристика фенотипической резистентности урогенитальных микоплазм, выделенных в период с 2006 по 2023 гг.

3.1.1 Характеристика антибиотикорезистентности клинических изолятов *Ureaplasma spp.*

Высокие показатели частоты обнаружения устойчивых форм *Ureaplasma spp.* зафиксированы в течение всего периода мониторинга антибиотикорезистентности (Рисунок 1).

Устойчивыми к действию одного и более антибактериальных препаратов оказались 85,7% *Ureaplasma spp.*

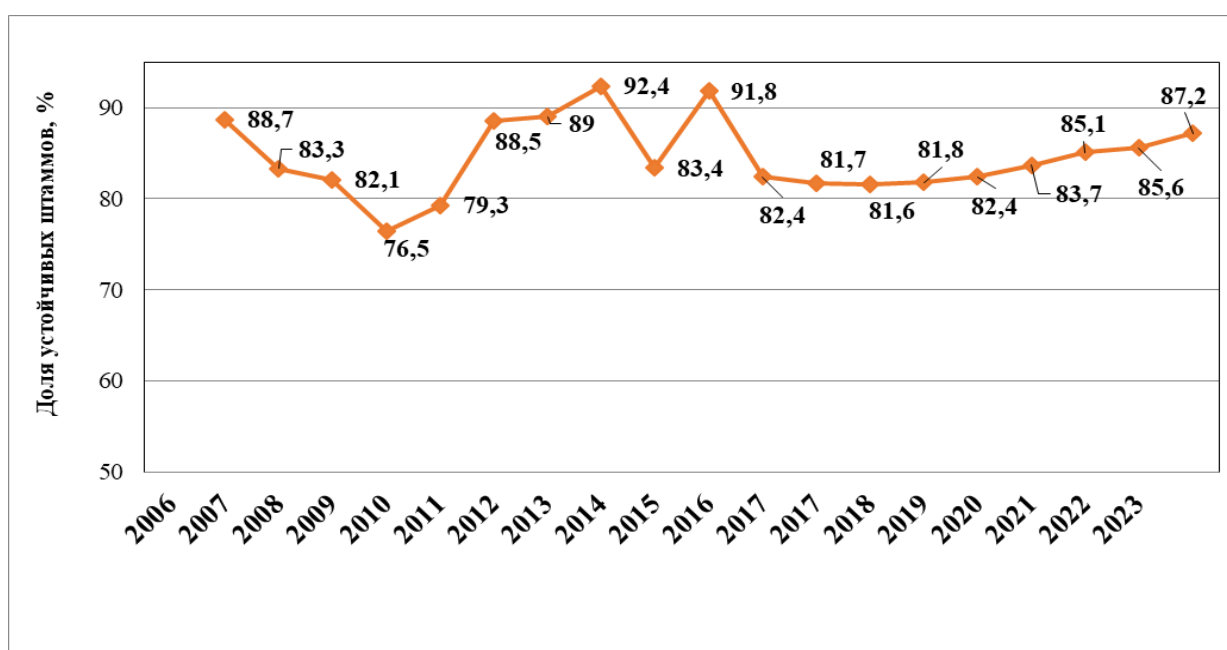


Рисунок 1 – Частота выявления антибиотикорезистентных форм *Ureaplasma spp.* в период с 2006 по 2023гг.

Высокие показатели частоты выявления антибиотикорезистентных уреаплазм зарегистрированы как в группе женщин (85,8%), так и в группе мужчин (82,3%).

Установлено, что подавляющее большинство изолятов уреаплазм характеризовалось устойчивостью к одному (41,4%) и/или к двум препаратам одного класса (49,1%), полирезистентные штаммы выявлялись реже (9,5%) (Рисунок 2).

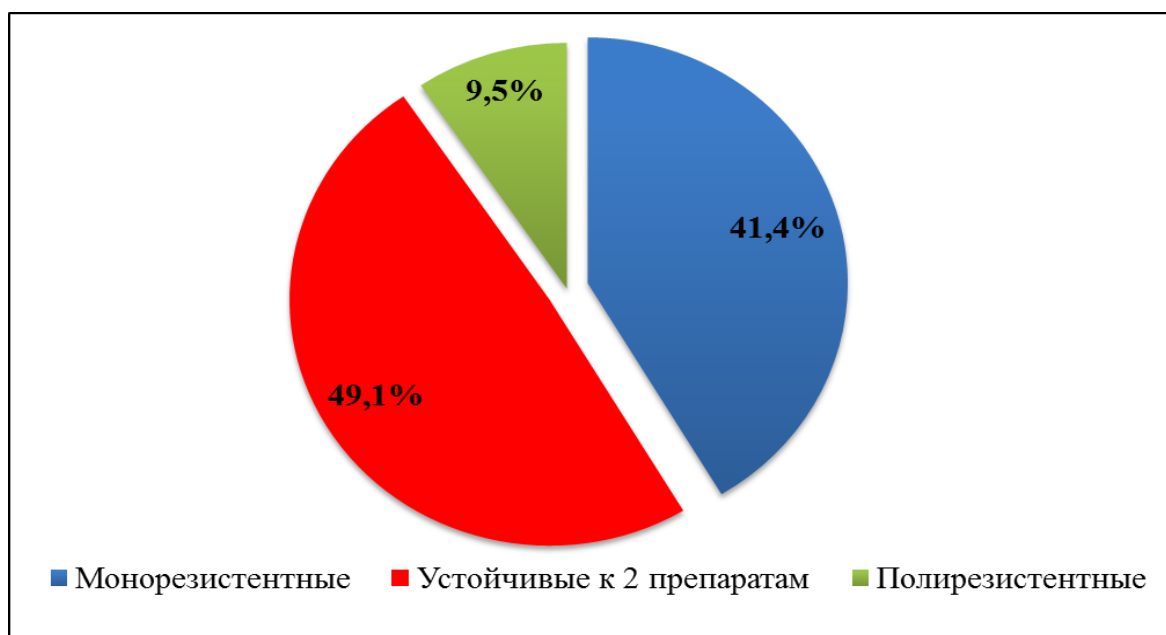


Рисунок 2 – Структура антибиотикорезистентности уреоплазм

Структура антибиотикорезистентности уреоплазм менялась в течение всего периода наблюдения (Рисунок 3). В частности, показатели частоты выявления уреоплазм, устойчивых к действию одного препарата, были высокими и варьировали - от 25,8% в 2006г. до 66,7% в 2015г. Следует отметить, что зарегистрировано снижение доли монорезистентных культур с 66,7% в 2016г. до 19,6% в 2023г. (Рисунок 3 -А).

Показатели частоты выявления изолятов уреоплазм, устойчивых к действию двух АБП, достигали высоких значений в период с 2006г. (44,4%) по 2012г. (83,0%), а с 2013г. (38,4%) наметилась тенденция к их снижению, в 2023г. доля резистентных к двум препаратам составила 25,0% (рисунок 3-Б).

Доля полирезистентных штаммов уреоплазм в течение всего периода мониторинга была невысокой и варьировала от 3,0% в 2012г. до 14,4% в 2017г.

Следует отметить, что с 2020г. (40,3%) зафиксировано резкое увеличение показателей частоты выявления полирезистентных штаммов уреоплазм, достигших максимальных значений в 2023г. (55,4%), что связано с интенсивной антибактериальной терапией в период пандемии SARS-CoV-2 (Рисунок 3 – В).

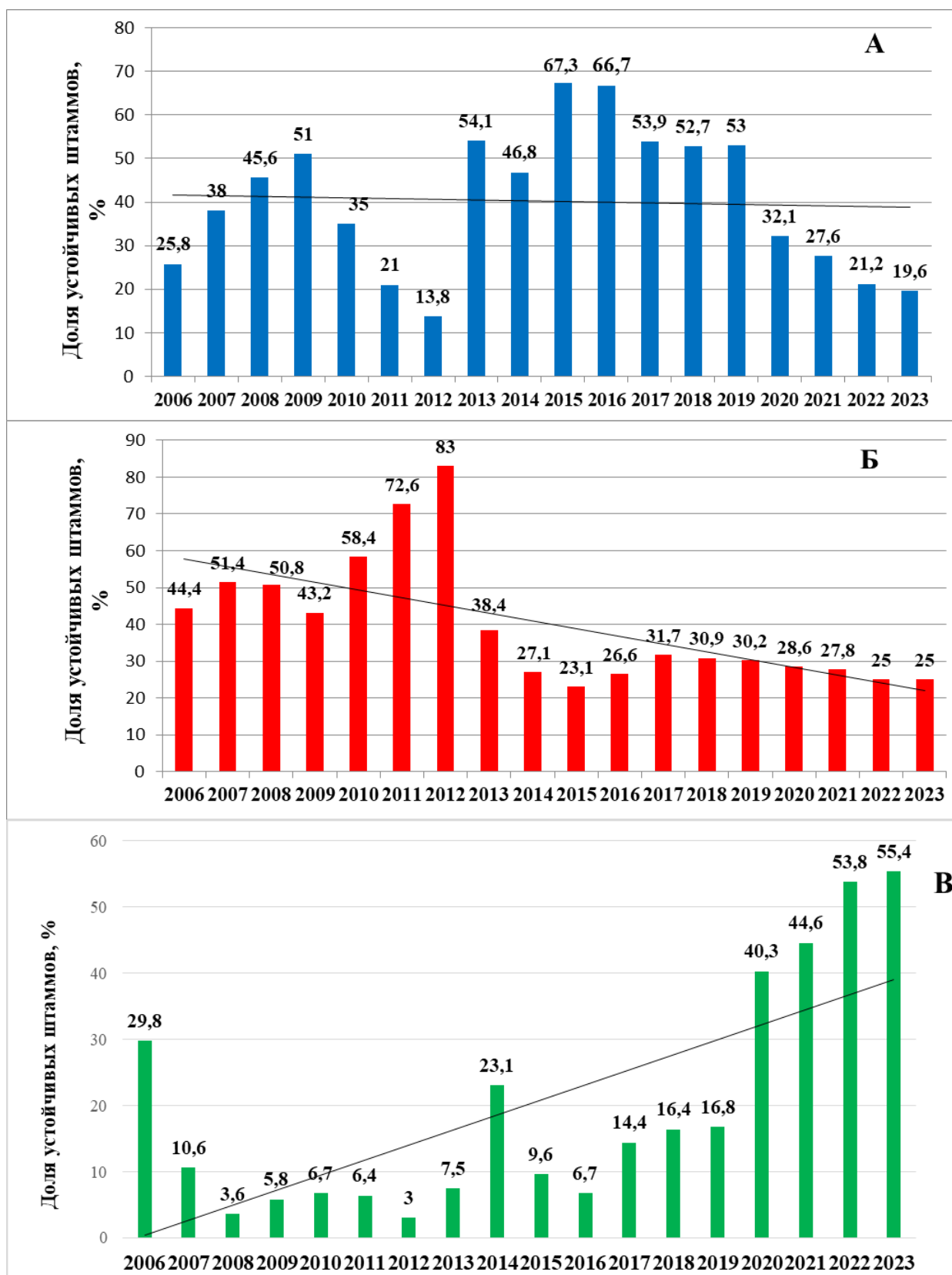


Рисунок 3 – Частота выявления монорезистентных (А), устойчивых одновременно к двум АБП (Б) и полирезистентных (В) штаммов *Ureaplasma spp.* в период с 2006г. по 2023г.

Резистентность клинических изолятов *Ureaplasma* к отдельным антибактериальным препаратам представлена на рисунке 4.

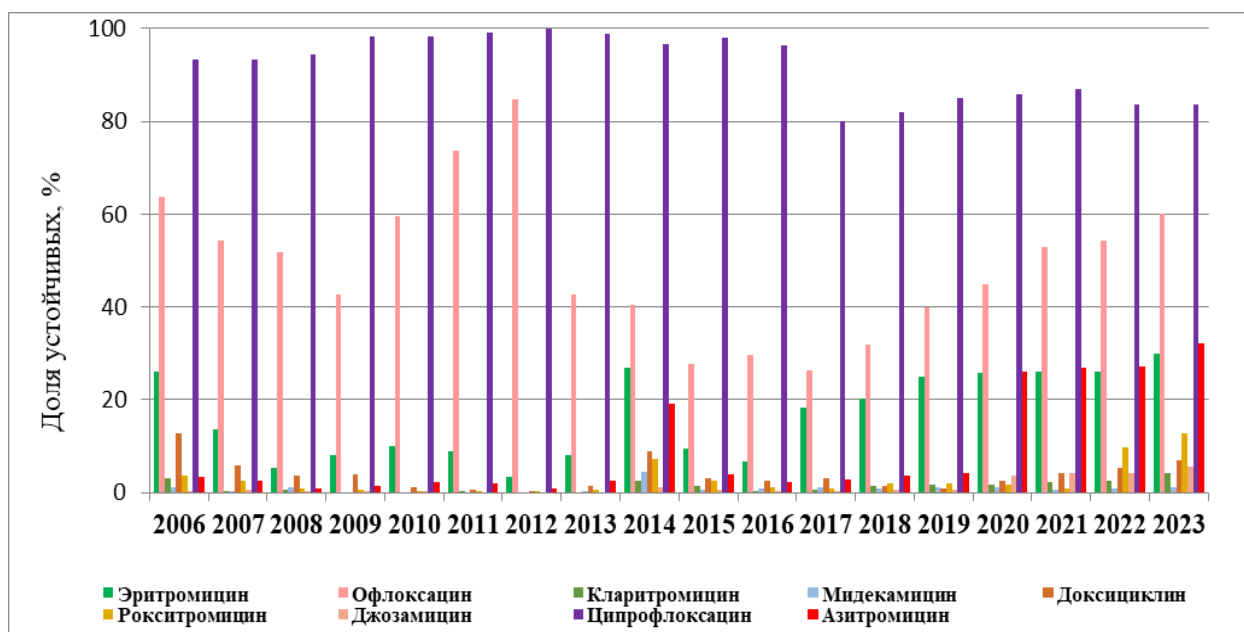


Рисунок 4 – Частота выявления *Ureaplasma spp.*, устойчивых к антибактериальным препаратам различных классов в период 2006-2023гг.

На протяжении всего периода исследования наблюдались высокие показатели частоты выявления резистентных штаммов уреаплазм к препаратам, которые наиболее часто применяются при лечении воспалительных заболеваний органов мочеполовой системы, а именно: к ципрофлоксацину, офлоксацину и эритромицину.

Доля ципрофлоксацин-резистентных уреаплазм на протяжении всего периода наблюдения была высокой и варьировала от 93,3% в 2006г. до 83,7% в 2023г. Доля офлоксацин-резистентных форм уреаплазм варьировала от 63,7% в 2006г. до 84,6% в 2012г., с 2013г. отмечалось снижение этого показателя с 42,7% до 26,4% (2017г.), однако с 2018г. (32,0%) вновь наметилась тенденция к росту (Рисунок 5).

Широкое распространение фторхинолон-резистентных штаммов уреаплазм также отмечено в работах итальянских [164], китайских [217] и отечественных исследователей [6, 41 – 45].

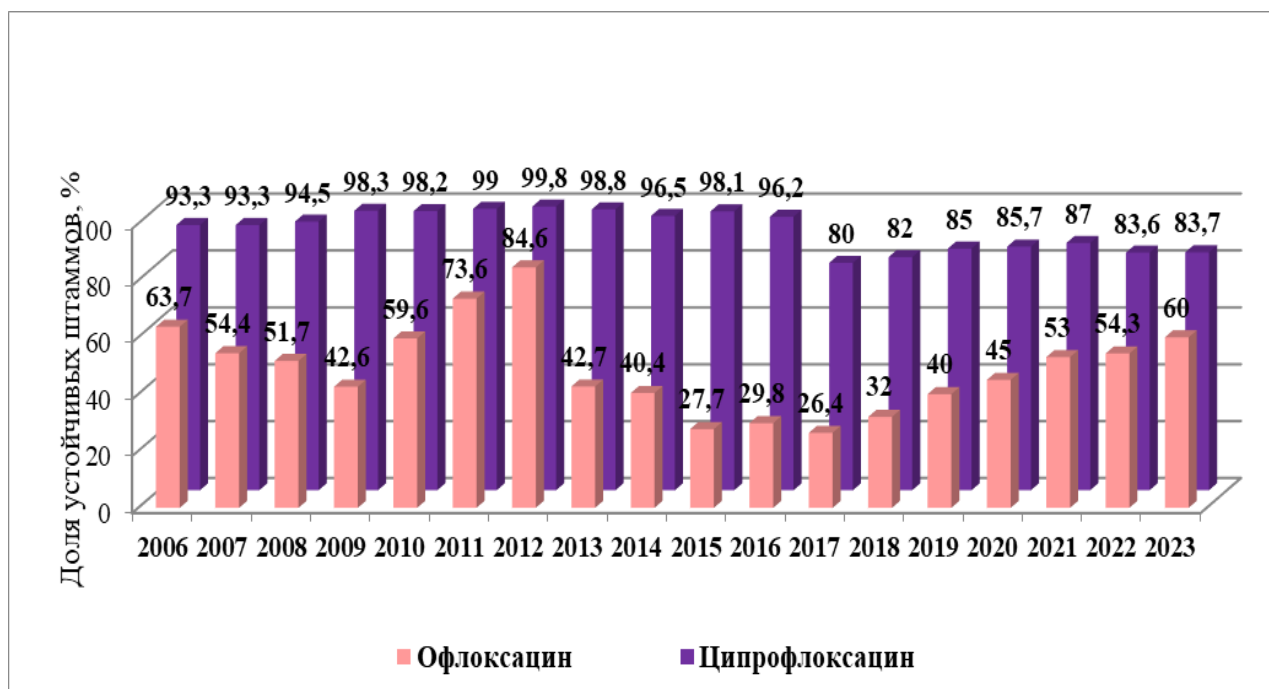


Рисунок 5 – Динамика частоты обнаружения фторхинолон-устойчивых *Ureaplasma spp.* в период с 2006г. по 2023г.

Эффективными и часто применяемыми антибактериальными препаратами при лечении воспалительных заболеваний органов мочеполовой системы являются макролиды. Представители группы макролидов по химическому строению делятся на 14 - членные (рокситромицин, эритромицин, кларитромицин), 15 - членные (азитромицин) и 16 - членные (джозамицин, мидекамицин, спирамицин) [135, 148, 166, 192, 196, 197, 213].

Анализ устойчивости клинических изолятов уреаплазм к действию 14 – членных представителей класса макролидов, показал, что наибольшее число штаммов проявляли устойчивость к природному макролиду – эритромицину (16,7%), на долю изолятов, устойчивых к рокситромицину в среднем приходилось 2,7% (Рисунок 6).

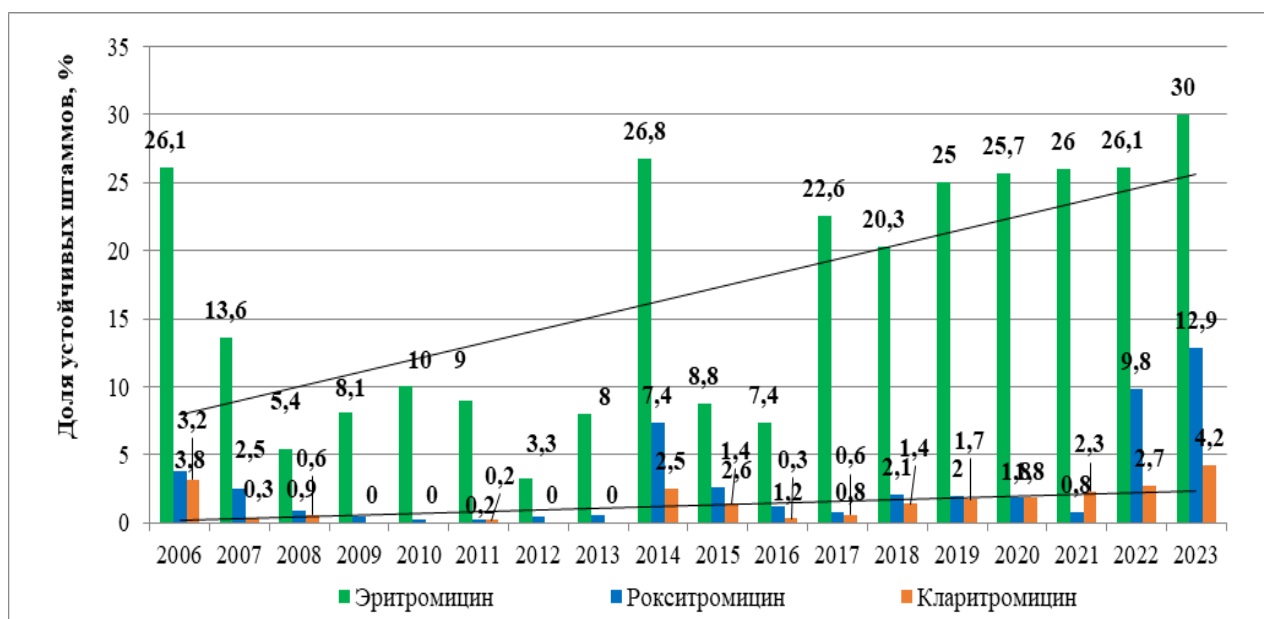


Рисунок 6 – Частота выявления *Ureaplasma spp.*, устойчивых к 14-членным представителям класса макролидов

В ходе проведенного нами исследования установлено, что наиболее эффективным препаратом из представителей 14-членной группы полусинтетических макролидов оказался кларитромицин. Примечательно, что в 2009г., 2010г., 2012г. и в 2013г. не было зарегистрировано ни одного случая обнаружения устойчивого к кларитромицину изолята уреаплазм. С 2022г. наметилась тенденция к росту числа кларитромицинустойчивых изолятов.

При изучении чувствительности *Ureaplasma spp.* к 15-ти и 16-ти членным представителям группы макролидов установлено, что показатели частоты обнаружения азитромицин-резистентных уреаплазм на протяжении всего периода мониторинга были примерно одинаковыми и находились в пределах от 0,8% до 3,5%, и лишь в 2014г. отмечены максимальные показатели 19,6% ($p < 0,01$), в последующие годы (до 2019г.) зафиксировано снижение показателей (4,1%), а с 2020г. наблюдается тенденция к увеличению данного показателя (26,1% в 2020г., 27,0% в 2021г., 27,1% - в 2022г., 32,1% - в 2023 г.) (Рисунок 7).

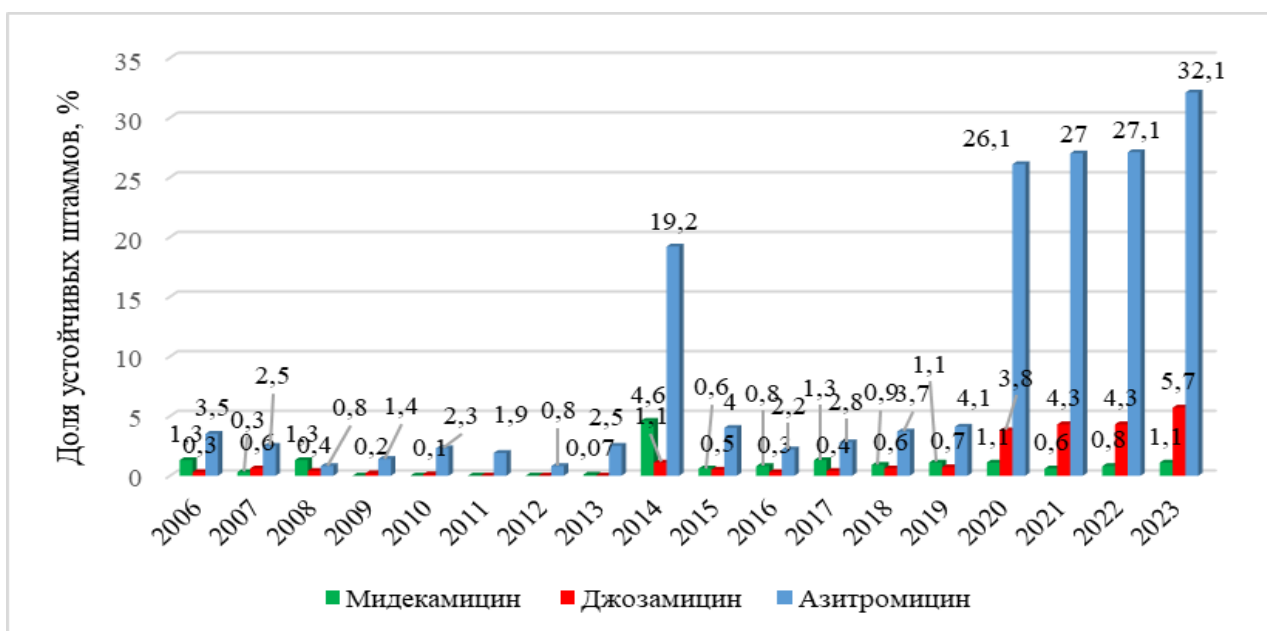


Рисунок 7 – Частота выявления *Ureaplasma spp.*, устойчивых к 15-и 16-членным представителям класса макролидов

Определено, что наиболее эффективными в отношении *Ureaplasma spp.* оказались препараты - мидекамицин и джозамицин, что совпадает с данными, полученными в других исследованиях [5, 110, 119, 133, 143, 146, 159, 166, 213]. Случаи выявления изолятов уреаплазм, характеризующихся устойчивостью к джозамицину, были единичными, а в период с 2011 по 2013гг. не зарегистрированы. Частота обнаружения мидекамицин-резистентных изолятов уреаплазм также была невысокой и составляла в среднем 0,6%, с 2009 по 2012гг. уреаплазм, устойчивых к мидекамицину, не обнаружено.

Третьим классом препаратов, которые активно используются при лечении урогенитальных инфекций, являются тетрациклины, в частности, доксициклин.

В течении всего периода наблюдения показатели частоты обнаружения уреаплазм, устойчивых к доксициклину, варьировали от 12,7% в 2006г. до 7,1% в 2023г. (Рисунок 8).

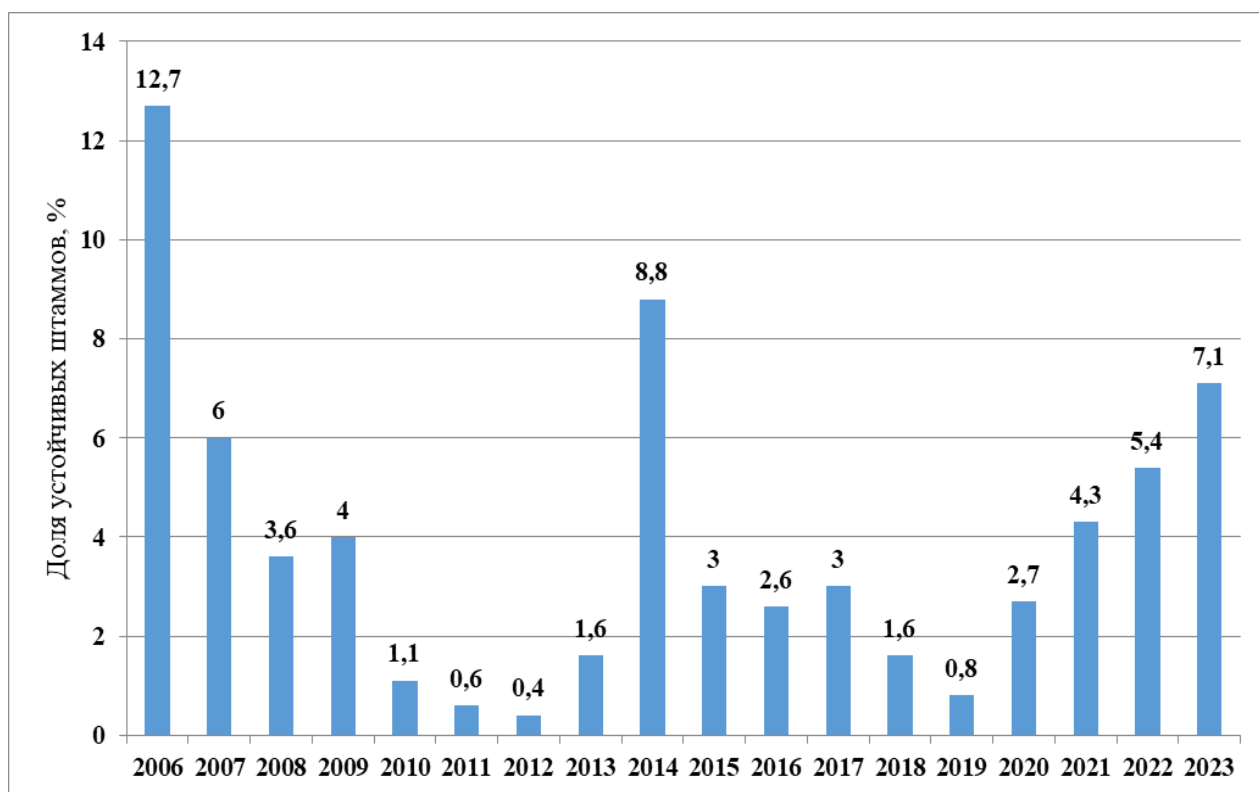


Рисунок 8 – Частота выявления изолятов *Ureaplasma spp.* устойчивых к доксициклину в период с 2006 по 2023гг.

Анализ спектров резистентности уреаплазм показал большое разнообразие комбинаций антибиотикоустойчивости к различным препаратам, выявлено более 40 вариантов. Наиболее часто встречающимися комбинациями являются: CIP - OFL (ципрофлоксацин-офлоксацин – 53,2%), CIP - ERM (ципрофлоксацин-эритромицин – 4,2%), CIP – OFL - ERM (ципрофлоксацин-офлоксацин-эритромицин – 4,3%), CIP – OFL – ERM - AZT (ципрофлоксацин-офлоксацин-эритромицин-азитромицин – 1,6%), CIP – OFL – AZT (ципрофлоксацин-офлоксацин-азитромицин – 0,8%), CIP – OFL - DOC (ципрофлоксацин-офлоксацин-доксициклин – 0,7%).

При определении уровней резистентности уреаплазм к антибиотикам установлено, что минимальные подавляющие концентрации (МПК) офлоксацина 1-4 мкг/мл, ципрофлоксацина 2-16 мкг/мл, эритромицина 4-8 мкг/мл, азитромицина, доксициклина, и мидекамицина составили 2-4 мкг/мл,

рокситромицина 4 мкг/мл, джозамицина 1-2 мкг/мл, кларитромицина 1-2 мкг/мл.

3.1.2 Фенотипическая характеристика антибиотикорезистентности клинических изолятов *Mycoplasma hominis*

Клинические изоляты *M.hominis* характеризовались меньшей устойчивостью к антибактериальным препаратам, чем уреаплазмы. Частота выявления устойчивых штаммов *M.hominis* была существенно ниже, чем уреаплазм и составила 10,3%. Аналогичные результаты получены в других исследованиях [24, 109, 110, 114, 121, 122, 146, 159, 161, 180, 186].

Не установлено достоверных отличий частоты выявления резистентных изолятов микоплазм в различные сезоны года.

Структура антибиотикорезистентности *M.hominis* представлена на рисунке 9.

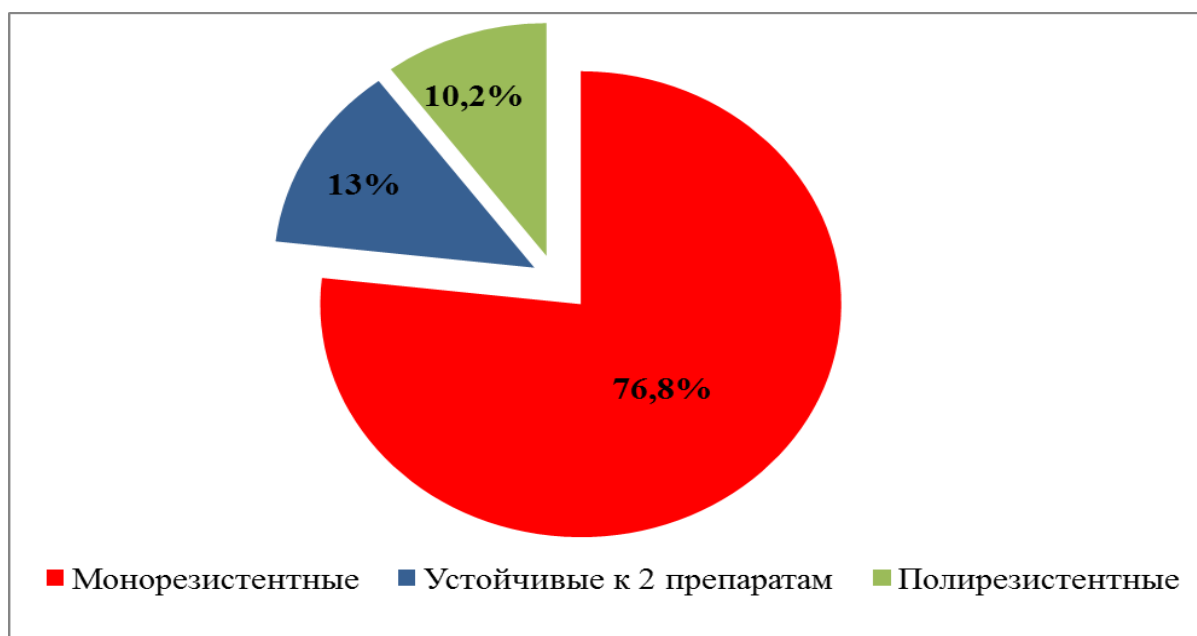


Рисунок 9 – Структура антибиотикорезистентности клинических изолятов *M.hominis*

Подавляющее большинство культур *M.hominis* характеризовались монорезистентностью (76,8%), частота обнаружения микоплазм устойчивых к

двум и/или трем антибактериальным препаратам была гораздо ниже и составила 13% и 10,2% случаев соответственно.

Следует отметить, что у изолятов *M.hominis* в течение всего периода исследования наблюдаются высокие показатели их устойчивости (10,3% из общего числа резистентных *M.hominis*) ко всем основным препаратам, применяемым при лечении воспалительных заболеваний органов УГТ (Рисунок 10).

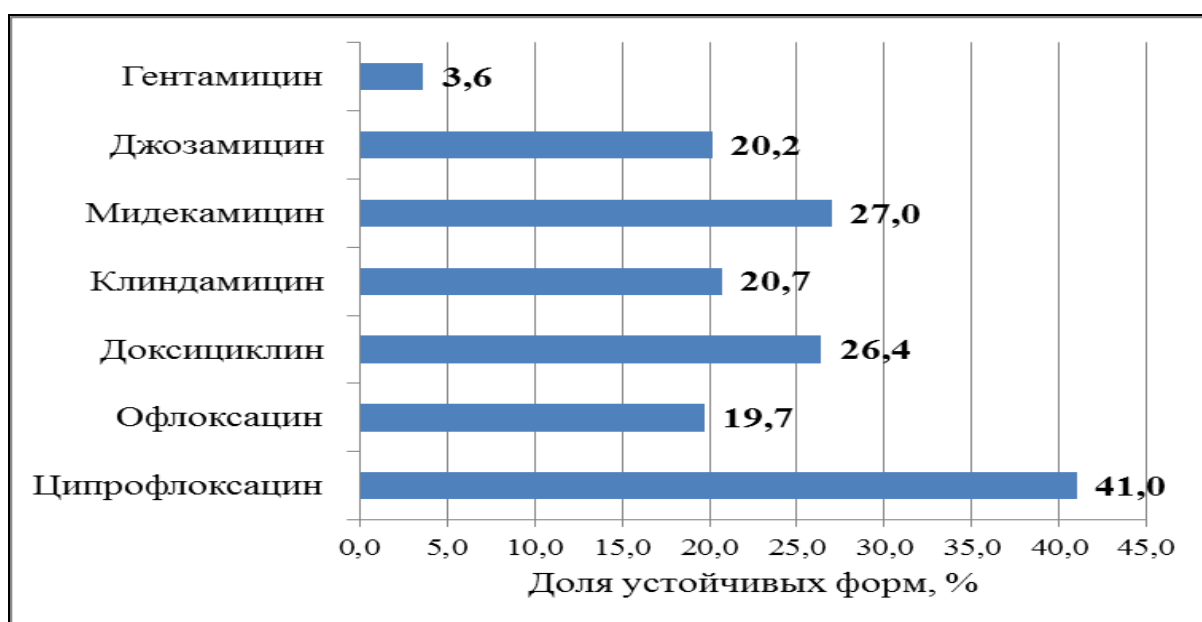


Рисунок 10 – Частота обнаружения резистентных культур *M.hominis* к различным антибактериальным препаратам в период с 2006 по 2023гг.

Определено, что 41% культур *M.hominis* оказались устойчивыми к ципрофлоксацину, 19,7% - к офлоксацину, 26,4% - к доксициклину, 27% - к мидекамицину, 20,7% - к клиндамицину, 20,2% - к джозамицину. Наибольшей активностью в отношении изолятов *M.hominis* обладал представитель класса аминогликозидов - гентамицин (3,6% резистентных культур), а с 2015г. случаев обнаружения микоплазм, устойчивых к гентамицину, не зафиксировано.

Спектры резистентности *M.hominis* были менее разнообразными, чем у уреаплазм, выявлено менее 10 вариантов комбинаций устойчивости.

Необходимо отметить, что результаты, полученные в нашем исследовании, согласуются с данными, представленными в литературе [24, 31, 109, 110, 114, 121, 122, 146, 169, 161, 180, 186, 217, 221].

Определены уровни резистентности *M.hominis* к антибактериальным препаратам. Минимальные подавляющие концентрации джозамицина варьировали от 0,5 до 1 мкг/мл, доксициклина от 0,5 до 4 мкг/мл, джозамицина от 0,5 до 1 мкг/мл, гентамицина и мидекамицина от 2 до 4 мкг/мл, клиндамицина от 0,2 до 0,5 мкг/мл, ципрофлоксацина и офлоксацина от 1 до 4 мкг/мл.

3.2 Механизмы антибактериальной устойчивости

Сведения о механизмах формирования резистентности у микоплазм и уреаплазм базируются на результатах исследования традиционных бактерий: *Esherichia coli*, *Staphylococcus spp.*, *Streptococcus spp.*) [100, 112, 116, 118, 129, 130, 132, 203, 214, 215].

Известно, что антибиотикорезистентность микроорганизмов бывает природная и приобретенная (Рисунок 11).



Рисунок 11 – Механизмы резистентности к антибактериальным препаратам

Микоплазмы и уреаплазмы характеризуются природной устойчивостью к антибиотикам, таким как, гликопептиды, фосфомицин и бета-лактамы антибиотиков, нарушающим синтез клеточной стенки. Неэффективен в отношении микоплазм и уреаплазм ряд других антибиотиков, таких как налидиксовая кислота, рифампицин, сульфаниламиды и др. [10, 11, 19, 38, 141, 182].

В основе развития приобретенной антибиотикорезистентности лежат механизмы, которые условно можно разделить на три группы.

Один из механизмов определяет невосприимчивость возбудителя к определенным группам антимикробных препаратов и связан с морфологическими особенностями микроорганизмов, другой - с присутствием в геноме бактерий генетических детерминант, кодирующих белки, которые связываются с мишенью антибиотика, или ферментативно разрушают его, или модифицируют клеточную мембрану, препятствуя проникновению препарата в клетку. Третья группа механизмов устойчивости связана с наличием точечных мутаций в генах - мишенях антибактериальных препаратов, а также белков, принимающих участие в процессе клеточной проницаемости и обратного транспорта [11, 84, 100].

Большое значение в формировании лекарственной устойчивости бактерий имеет процесс эффлюкса, заключающийся в активном выведении антибиотиков из микробной клетки [100, 134, 138, 152, 183, 195]. Известны пять эффлюксных систем, играющих существенную роль в адаптации классических бактерий к антибиотикам – ABC (ATP-binding cassette superfamily), MATE (Multidrug and toxic compound extrusion family), SMR (small multidrug resistance family), MFS (major facilitator superfamily) и RND (resistance-nodulation-cell division superfamily) [100, 138, 183, 184, 195] (Рисунок 12).

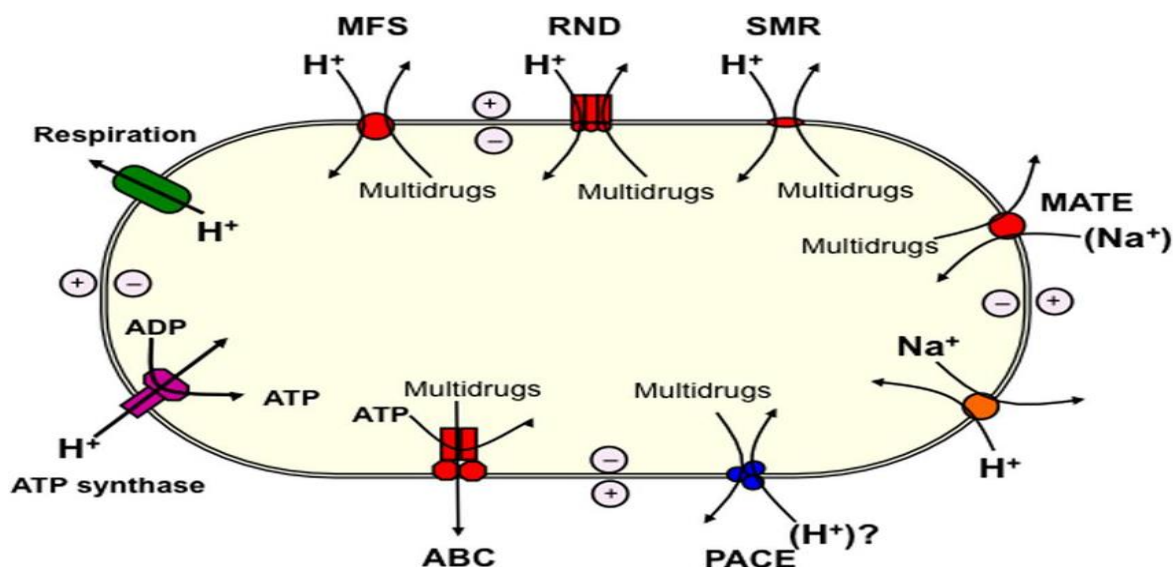


Рисунок 12 - Основные классы и характеристика эффлюксных систем [195]

В процессе возникновения устойчивости к антибиотикам урогенитальных микоплазм принимает участие эффлюксная система – ABC, что подтверждено экспериментально [100].

Показано, что уровень чувствительности штаммов разных видов микоплазм и уреаплазм к антибиотикам может существенно отличаться даже при совпадении механизмов резистентности. У ряда видов урогенитальных микоплазм установить механизм антибиотикорезистентности не всегда удается. Это указывает на наличие у представителей класса молликут более сложных, не описанных ранее механизмов адаптации к антибиотикам [11, 19, 38, 100, 101, 141, 170].

Для элиминации урогенитальных микоплазм наиболее часто применяются препараты, блокирующие репликацию и транскрипцию ДНК в бактериальной клетке (фторхинолоны) и препараты, ингибирующие биосинтез белка на рибосомах (тетрациклины и макролиды). Следует отметить, что широкое и бесконтрольное использование данных классов препаратов привело к существенному росту показателей частоты обнаружения антибиотикорезистентных штаммов микоплазм и уреаплазм [3, 5, 9, 14, 16, 18, 27, 31, 41 – 44, 50, 51, 55, 60, 65, 74, 77, 95, 100, 104, 105, 109,

110, 112, 119, 121, 124, 126, 129, 135, 139, 140, 143, 146, 148, 155, 156, 159, 162 – 166, 169, 186, 190 – 192, 196, 205, 207].

3.2.1 Механизмы резистентности к фторхинолонам

Молекулярные механизмы антибактериальной активности препаратов фторхинолонового ряда заключаются в ингибировании ферментов ДНК-гиразы и ДНК-топоизомеразы, участвующих в процессе синтеза ДНК и делении клетки [113, 117].

Фторхинолон-устойчивость уреаплазм и микоплазм чаще связана с мутациями в области QRDR (Quinolone Resistance-Determining Region) генов – мишеней – *gyrA* (субъединица А ДНК-гиразы), *gyrB* (субъединица В ДНК-гиразы), *parC* (субъединица А топоизомеразы IV), *parE* (субъединица В топоизомеразы IV) [113 – 115, 117, 118, 153, 154, 191, 214, 215]. В большинстве случаев микоплазмы и уреаплазмы обладают перекрестной устойчивостью к препаратам этой группы. Количество и локализация мутаций в генах топоизомераз определяет уровень устойчивости бактерий. Показано, что при высоких концентрациях ципрофлоксацина происходит активное выведение антибиотика из бактериальных клеток, не имеющих мутаций по QRDR-локусу [11, 100, 192, 195, 205].

Низкие концентрации ципрофлоксацина способствуют выведению из клетки лекарственного препарата с помощью эндогенных насосов типа ABC. В геноме некоторых микоплазм обнаружены гены ABC-типа, аннотированные как «гены множественной лекарственной устойчивости - MDR» (Multiple Drug Resistance). При высоком уровне экспрессии генов ABC-типа урогенитальных микоплазм можно говорить о MDR-фенотипе [100].

В настоящее время рассматривается существование и других способов формирования фторхинолон - резистентности урогенитальных микоплазм. Одним из таких способов является продуцирование ими внеклеточных везикул. Везикулы представляют собой сферические окруженные

двухслойной мембраной наноструктуры, высвобождаемые клетками микоплазм в оптимальных и стрессовых условиях, характеризуются умеренной или пониженной электронной плотностью. Роль везикул грамотрицательных бактерий в процессе транспорта генов - мишеней фторхинолонов (*gugA*, *gugB*, *parC* и *parE*) и формировании антибиотикорезистентности бактериальной популяции была доказана в 1996 году [33, 102, 103]. Впервые участие внеклеточных везикул в развитии устойчивости микоплазм к фторхинолонам было установлено на примере представителя класса Mollicutes - *Acholeplasma laidlawii* [174]. Показано также возможное участие везикул в горизонтальном переносе генов бактерий, что способствует быстрому распространению мутантных генов в бактериальной популяции [10, 33, 102, 103, 174].

Внеклеточные везикулы – сферические объекты, окруженные мембраной наноструктуры диаметром менее 0.2 мкм, продуцируются грамотрицательными, грамположительными бактериями, а также археями и микоплазмами.

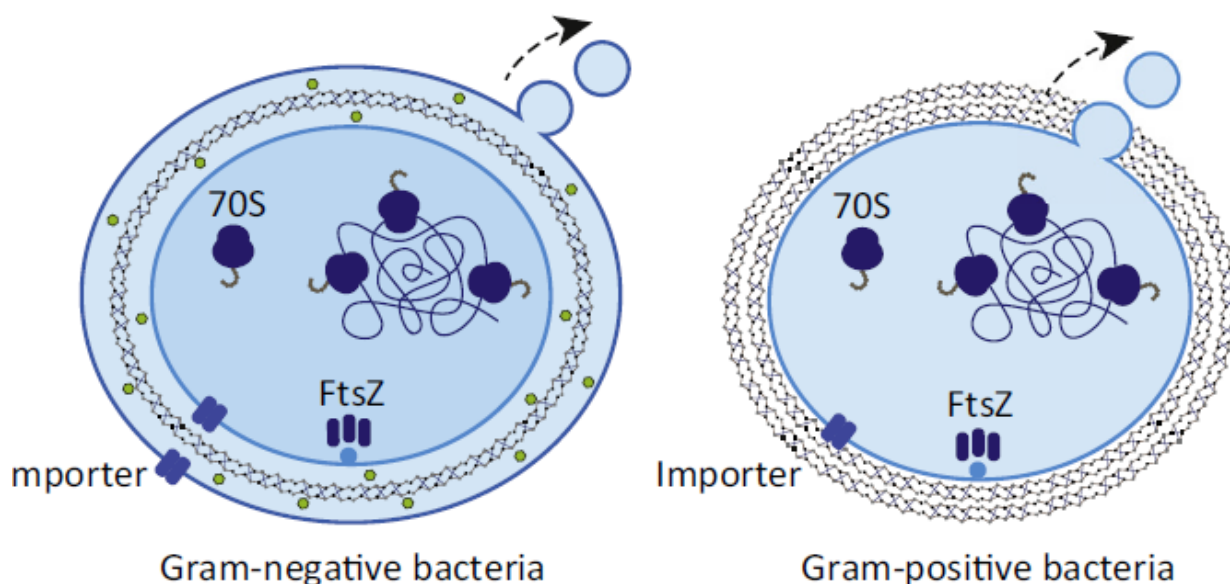


Рисунок 13 - Изображение внеклеточных везикул грамположительных и грамотрицательных бактерий [142].

Везикула, образованная внешней мембраной грамотрицательной бактерии, включает липополисахариды (ЛПС), а также часть периплазмы, с входящими в ее состав белками. Белковая часть мембраны везикулы образована внешними мембранными белками OMP, LamB, а также рядом белков, ответственных за сигналинг и клеточный транспорт, таких как OmpC, OmpF, NmpC, OmpX, OmpA, LppA, LppB, Pal, TolB. Помимо мембранных компонентов везикулы грамотрицательных бактерий могут содержать цитоплазматические белки, токсины, а также ДНК и РНК.

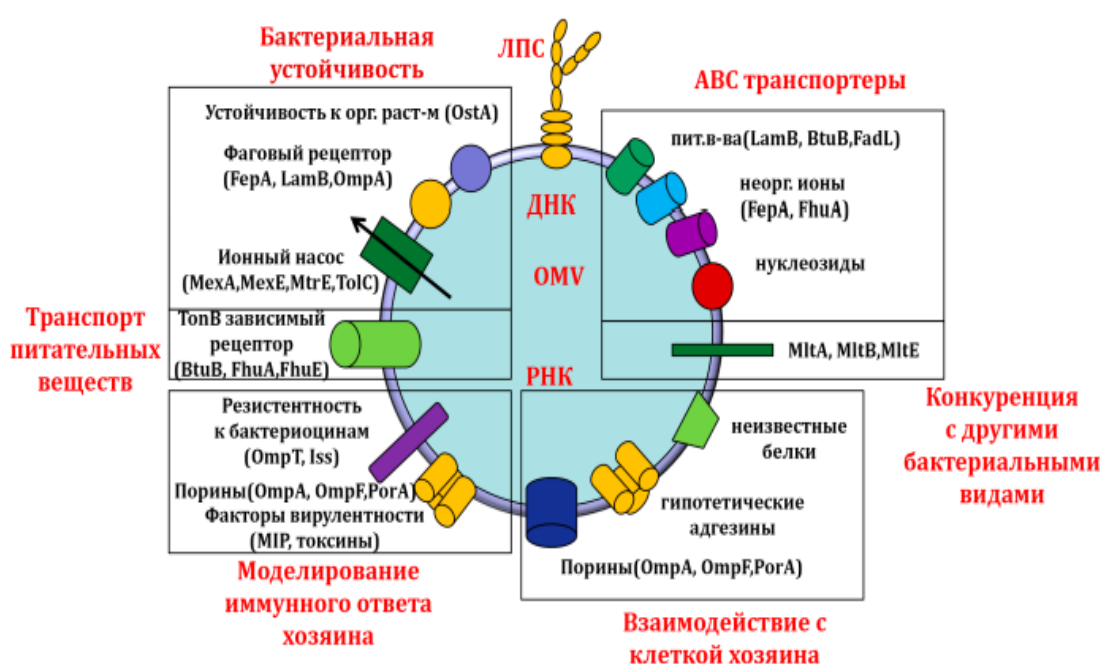


Рисунок 14 - Структура везикул на примере грамотрицательных бактерий [33]

Примечание: Красным выделены основные функциональные блоки, характеризующие белки, находящиеся на мембране везикулы.

Внеклеточные везикулы осуществляют перенос широкого спектра компонентов, детерминант вирулентности, резистентности к антибактериальным препаратам, участвуют в передаче сигналов и межклеточных взаимодействиях.

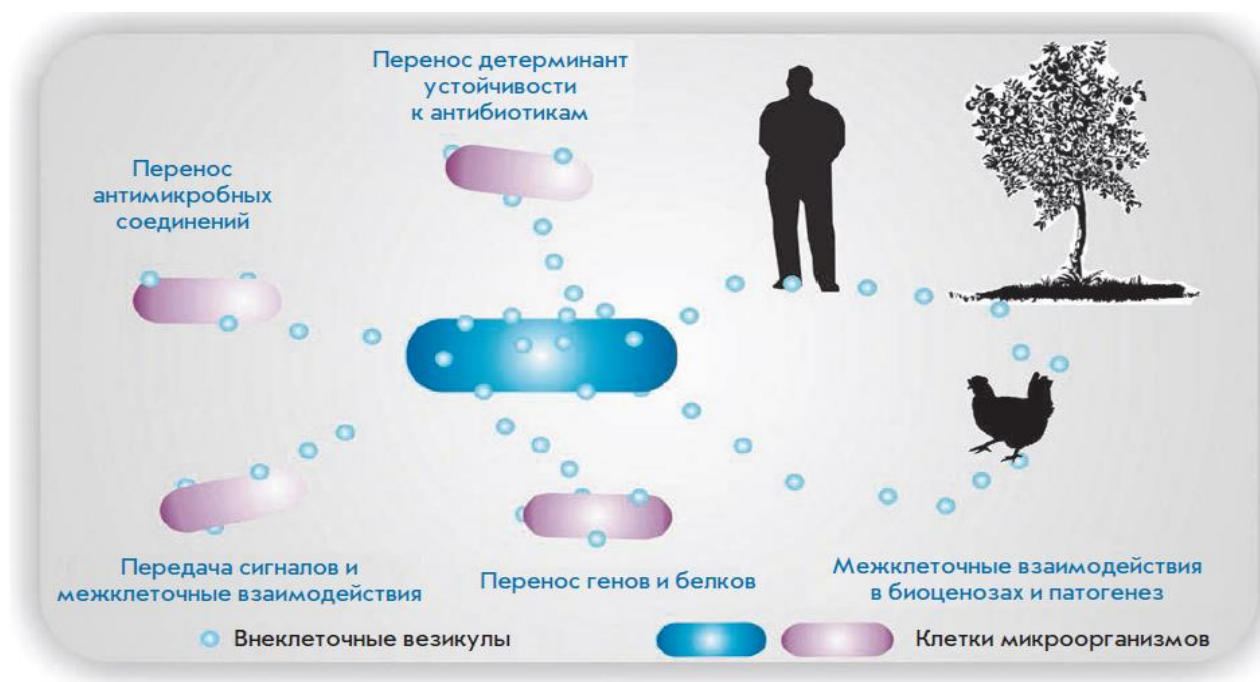


Рисунок 15 - Функции внеклеточных везикул [103]

В последнее время в литературе появилось значительное количество сообщений об активной роли в адаптации бактерий к стрессорам, в том числе, к антибиотикам, внеклеточных везикул. Так, группа исследователей под руководством профессора, д.б.н. В.М. Чернова (Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр РАН») на примере фторхинолон-резистентных культур *Acholeplasma laidlawii* определили состав внеклеточных мембранных везикул и установили их роль в развитии устойчивости микоплазм к фторхинолонам. В составе внеклеточных везикул *Acholeplasma laidlawii* преобладают цитоплазматические белки, значительную долю которых составляют белки, участвующие в энергообразовании, трансляции, транспорте и метаболизме углеводов, ДНК и РНК (Рисунок 16) [103]. Набор везикулярных белков различается как у разных штаммов, так и одного и того же штамма в присутствии/отсутствии антибиотика.

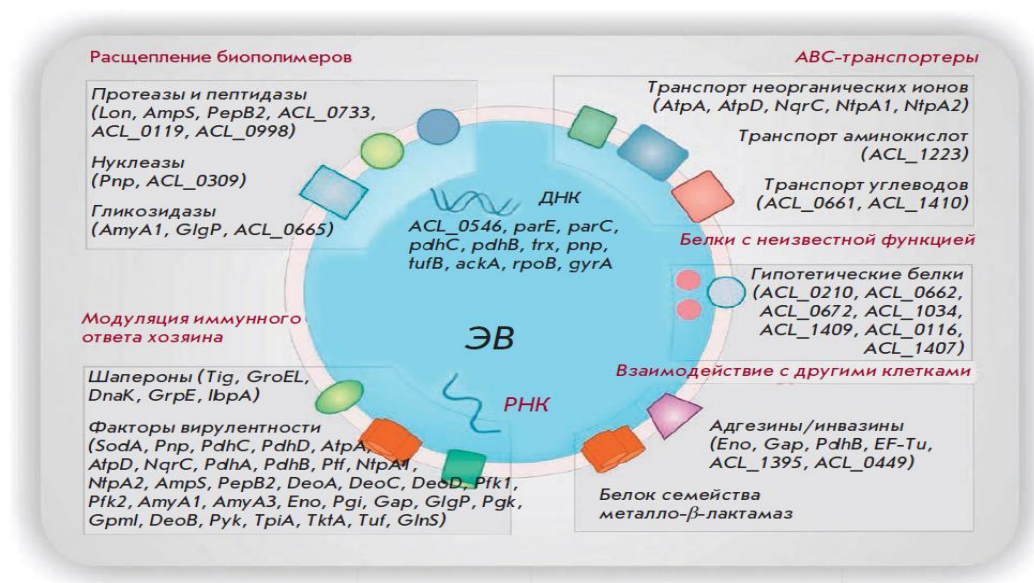


Рисунок 16 - Состав внеклеточных мембранных везикул фторхинолон-резистентных культур *Acholeplasma laidlawii* [103]

При использовании трансмиссивной электронной и атомно-силовой микроскопии, штаммы *A. laidlawii* продуцируют везикулы, которые обнаруживаются на поверхности клеток и обособленно; имеют сферическую форму, гетерогенны по размерам и электронной плотности. Диаметр большинства везикул варьирует от 50 до 120 нм [11].

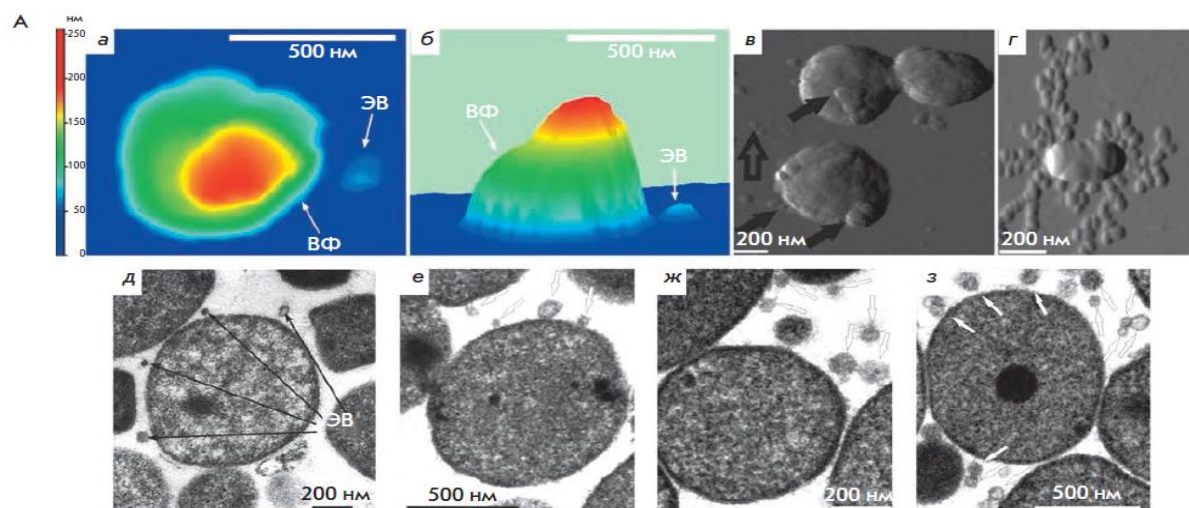


Рисунок 17 - Строение везикул *A. laidlawii* [11]

Примечание: А – атомно-силовая (а, б, в), трансмиссивная электронная (д–з) микроскопия клеток культуры *A. laidlawii* PG8 и атомно-силовая микроскопия клеток *M. gallisepticum* S6 (г). ЭВ – внеклеточная везикула; ВФ – вегетативные формы

Установлено, что везикулы, продуцируемые клетками микоплазм, содержат копии последовательностей генов мишеней фторхинолонов. В случае *A. laidlawii* PG8R10 везикулы транспортировали мутантные гены целевых белков. Так, в последовательности *gyrA*-гена штамма *A.laidlawii* PG8R10 была обнаружена точечная мутация (Г-271-Т, определяющая замену Asp-91-Tyr), которая также регистрировалась в транспортируемой везикулами нуклеотидной последовательности гена. Аналогичная ситуация наблюдалась и для последовательности гена *parC* – транзиция (Ц-272-Т, определяющая замену аминокислоты Ser-91-Leu). Наличие нуклеотидных последовательностей ДНК в составе везикул микоплазм определяет потенциальную возможность горизонтального переноса генов и, соответственно, распространения детерминант устойчивости к лекарственным препаратам в бактериальных популяциях.

Следует отметить, что в составе везикул штаммов микоплазм были обнаружены гены, продукты которых ассоциированы с адаптацией ряда бактерий к другим антимикробным препаратам – *acl_0211* (кодирует гидролазу β-лактамазного семейства) и *groV* (кодирует β-субъединицу ДНК-зависимой РНК-полимеразы). Мутации в последовательности гена *acl_0211* ассоциированы с формированием устойчивости к пенициллинам и цефалоспорином, а *groV* – к рифампицину. Поскольку в отношении этих препаратов микоплазмы индифферентны, возможно, они обеспечивают устойчивость к данным антибиотикам других бактерий. Примеры такой взаимопомощи в микробных сообществах описаны ранее в литературе [10, 103]. Таким образом, тахителичность и возможность приобретения чужеродного генетического материала путем горизонтального переноса генов, позволяет рассматривать микоплазмы как природный резервуар распространения детерминант резистентности.

Другим интересным фактом было то, что при культивировании микоплазм (*A.laidlawii*) на средах с добавлением ципрофлоксацина в составе везикул регистрировалось присутствие этого антибактериального препарата.

Однако, его количество в составе везикул у *A.laidlawii* PG8R10 достоверно превосходит ($p<0.05$) соответствующие показатели штаммов *A.laidlawii* PG8B и *A.laidlawii* PG8S (рисунок 18).

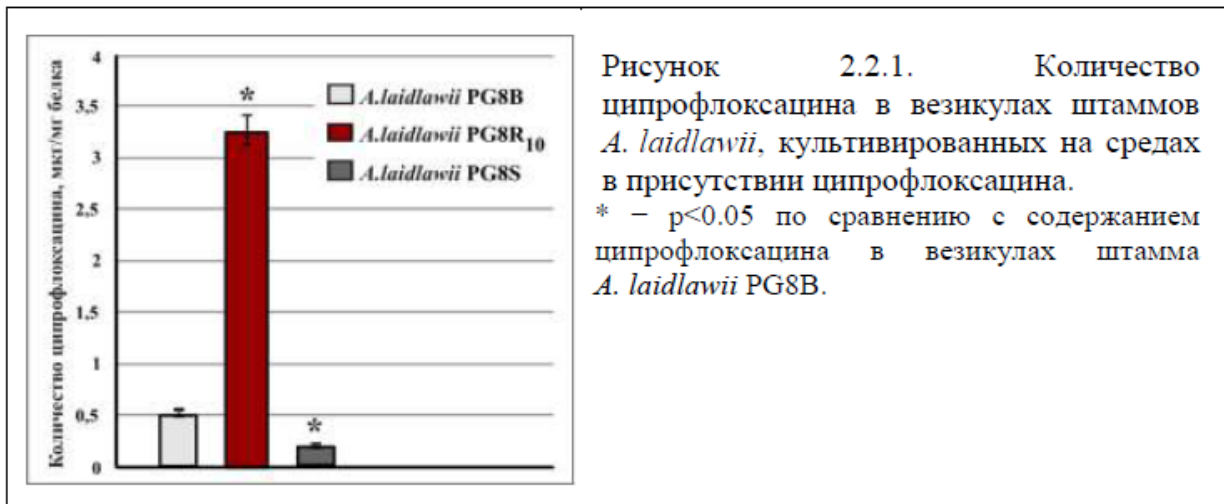


Рисунок 18 - Количество ципрофлоксацина в везикулах штаммов *A.laidlawii* [10, 103]

Данные, полученные Черновым В.М. с соавт., свидетельствуют о том, что внеклеточные везикулы *A.laidlawii* связаны с процессом выведения ципрофлоксацина из бактериальной клетки, инициируя развитие устойчивости микоплазм к антибиотику.

Экспериментально доказано, что механизмы устойчивости микоплазм обусловлены не только классическими мутациями в QRDR области генов мишеней фторхинолонов (*gyrA* и *parC*), но и экспортом нуклеотидных последовательностей генов мишеней различных антибактериальных препаратов и системой выведения антибиотика из клетки посредством внеклеточных везикул.

Новые знания о роли внеклеточных везикул в формировании антибиотикорезистентности микоплазм свидетельствуют о необходимости разработки антимикробных препаратов, эффективно воздействующих на бактериальную клетку.

3.2.2 Механизмы резистентности к тетрациклинам и аминогликозидам

Действие препаратов тетрациклинового ряда и аминогликозидов направлено на подавление синтеза белка микробной клетки на уровне рибосом путем блокировки связывания с различными сайтами тРНК на А (акцепторном) участке рибосомы 30S [20, 84, 85]. Резистентность к аминогликозидам бактерий, как правило, связана с ферментативным ингибированием антибиотика, модификацией мишени действия (30S субъединицы рибосомы), снижением проницаемости мембраны, а также с активным выведением антибиотика из клетки.

Основными механизмами развития резистентности к тетрациклинам у «классических бактерий» считают активное выведение антибиотика из клетки за счет работы белков Tet(A), Tet(B), Tet(C), Tet(D), Tet(E), Tet(G), Tet(H), Tet(I) и др. семейства MFS транспортеров; продукцию белков, защищающих рибосомы (Tet(M), Tet(O), Tet(S), Tet(W), Tet(32), Tet(36), TetB(P), Otr(A), Tet(Q) и Tet(T)), модификацию мишеней (16S рРНК, рибосомные белки), а также деградацию антибиотика при помощи ферментов (Tet(X)) [86, 87, 121, 129, 159, 174].

В формировании резистентности урогенитальных микоплазм к тетрациклинам в ряде случаев принимают участие подвижные генетические элементы IS-элементы и транспозоны (TN), которые могут участвовать в переносе генов между разными бактериями, в том числе филогенетически неродственными.

Примером такого события является приобретение микоплазмами стрептококковой детерминанты *tetM*, обуславливающей резистентность к тетрациклинам путем изменения конформации рибосомы, вследствие чего изменяется сродство антибактериального препарата и его мишени. Мобильным элементом, осуществляющим конъюгативный перенос детерминанты *tetM*, является транспозон Tn 916, который обеспечивает защиту рибосом от действия тетрациклинов [87, 121].

Существует вероятность того, что при приобретении микоплазмами tet-M детерминанты резистентности происходят глобальные перестройки в структуре приобретенной детерминанты [86, 87, 100, 121, 129]. Показано, что необходимо время для изменения структуры синтезируемой tet-M детерминанты под рибосомный профиль микоплазм и начала ее функционирования. В литературе описаны случаи выделения штаммов микоплазм, содержащих в геноме tet-M детерминанту, чувствительных к тетрациклинам. Известно, что устойчивость микоплазм и уреоплазм к препаратам тетрациклиновой группы также может быть связана с мутациями в тетрациклин-связывающем блоке 16S рРНК [100, 121, 129, 159, 174].

3.2.3 Механизмы резистентности к макролидам и линкозамидам

Химическая структура макролидов и линкозамидов существенно различается, однако они обладают общим механизмом антибактериального действия. Механизм резистентности макролидов и линкозамидов связан с торможением биосинтеза белка за счет связывания с 50S-субъединицей рибосомы (включая 23S рРНК и некоторые рибосомные белки L4 и L22) [84, 100, 130, 132, 133, 180, 197, 203]. Эти препараты обладают сродством к II и V доменам рРНК. Нуклеотидные последовательности в положениях A2058, A2059 и G2505 V домена 23S рРНК являются основными точками связывания антибиотика и мишени действия, что приводит к нарушению сборки 50S субъединицы РНК и процессу удлинения цепи. В результате приостанавливается процесс формирования и наращивания пептидной цепи [203].

Развитие устойчивости к макролидам и линкозамидам у микоплазм в большинстве случаев связано с нуклеотидными заменами в генах, кодирующих рибосомные белки L4, L22 и центральной петли V домена 23S рРНК, в ряде случаев - со структурными изменениями 50S субъединицы рибосомы, а также с активным выведением антибиотиков из клетки [134, 138, 152, 183, 195]. У бактерий рода *Ureaplasma* также было установлено

появление резистентности к макролидам в результате метилирования рРНК посредством *erm* генов (*ermB*), а также выведения препаратов, опосредованного продуктами генов *msrA*, *msrB* или *msrD* [131]. Мутации в соответствующих зонах гена 23S рРНК обуславливают устойчивость урогенитальных микоплазм к различным (14-, 15-, 16-членным) представителям группы макролидов [5, 110, 119, 133, 143, 146, 159, 166, 213].

ГЛАВА 4 ЛАБОРАТОРНЫЕ МЕТОДЫ ИНДИКАЦИИ И ИДЕНТИФИКАЦИИ УРОГЕНИТАЛЬНЫХ МИКОПЛАЗМ

4.1 Микробиологические методы

Полиморфизм клинических проявлений и длительное бессимптомное течение заболевания значительно осложняют клиническую диагностику инфекций, ассоциированных с урогенитальными микоплазмами, поэтому результаты лабораторных исследований играют решающую роль в постановке диагноза [16, 18, 23, 32, 59, 70, 71, 78, 81, 91, 98, 99, 157].

В этиологической диагностике урогенитальных инфекций наиболее часто применяются микробиологические и молекулярно-генетические методы исследования. Материалом для исследования служат у женщин – образцы соскобов эпителия заднего свода влагалища, цервикального канала, уретры первая порция утренней мочи, у мужчин – первая порция мочи и соскоб эпителия уретры, реже – эякулят и секрет предстательной железы. Отбор образцов биологических субстратов проводят с использованием одноразовых щеток. Для получения максимально достоверных результатов этиологической диагностики инфекций, ассоциированных с генитальными микоплазмами, важно соблюдать ряд требований преаналитического этапа, а именно, забор биоматериала следует проводить до применения антибактериальной терапии или не ранее чем через месяц после ее окончания; соскоб эпителия уретры - проводить через три часа после последнего мочеиспускания, соскоб эпителия цервикального канала и влагалища следует отбирать перед началом менструального цикла или через 1-2 дня после его окончания [16, 57, 71, 78, 99].

Классическим методом индикации и идентификации *M.hominis*, *U.urealyticum* и *U.parvum* является микробиологический (культуральный). Данный метод позволяет обнаружить возбудителя, а также определить его количественное содержание в исследуемом материале. Клинически значимый титр бактериальных агентов составляет 10^4 КОЕ/мл и более. Для культивирования микоплазм и уреаплазм применяют плотные, жидкие и

полужидкие питательные среды, содержащие антибиотики, которые ингибируют рост посторонней микрофлоры. Сроки инкубации посевов обусловлены типом, составом используемых питательных сред, видом урогенитальных микоплазм и варьируют от 48 до 144 часов. В состав питательных сред входят пептоны (ферментативный перевар из бычьих сердец), стеролы (холестерин и его производные), жирные кислоты, гликолипиды, фосфолипиды и фосфогликолипиды. Дифференциально-диагностические среды для культивирования *Ureaplasma spp.* содержат мочевины, для *M.hominis* – аргинин. Ферментация мочевины и аргинина урогенитальными микоплазмами приводит к изменению pH, и, как следствие, цвета среды, что обусловлено образованием аммиака [11, 19, 38, 100].

В настоящее время разработаны отечественные коммерческие стандартизированные питательные среды, позволяющие выявлять *M. hominis* и *Ureaplasma spp.*, производства ЦНИИЭ Роспотребнадзора («Микоплазма Микротест», «Уреаплазма Микротест»), НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Пастера («Микоплазма -50», «Уреаплазма – 50»), ТОО «Диагност» на базе Омского НИИ природно-очаговых инфекций. Существуют зарубежные микробиологические тест-системы для индикации и идентификации урогенитальных микоплазм, например - «MYCOFAST Evolution 3» (производитель EliTech), «Mycoplasma DUO Kit» (производитель Bio-Rad), «MYCOPLASMA IST 2» (производитель BioMerieux) [187].

Микробиологический метод индикации *M. hominis*, *U. urealyticum* и *U. parvum* является «золотым стандартом» выявления данных бактерий. Он прост, доступен, информативен, малозатратен.

4.2 Серологические методы

Серологические методы направлены на выявление антигенов *M. hominis* и *U. urealyticum*, *U. parvum*, в связи с антигенной мимикрией, характерной для представителей семейства *Mycoplasmataceae*, большой вариабельностью серотипов, практически не применяются [16, 23]. Данные методы

используются лишь для серотипирования чистых культур *U.urealyticum*, *U.parvum* [17, 23].

4.3 Молекулярно–генетические методы

Для этиологической диагностики урогенитальных инфекций широко используется метод полимеразной цепной реакции (ПЦР) и её модификации. Данный метод позволяет исследовать любой биологический субстрат, обладает высокой чувствительностью, специфичностью, возможностью одновременного исследования большого числа проб, скоростью получения результата и не зависит от числа жизнеспособных клеток возбудителя [32, 70, 91].

В основе ПЦР метода лежит многократное увеличение уникальных фрагментов нуклеиновых кислот с помощью термостабильной Tag-полимеразы, что позволяет получить необходимое количества ДНК искомого возбудителя. При проведении ПЦР используют два праймера, гибридизующихся комплементарно с противоположными цепями ДНК и ограничивающих участок молекулы, который будет амплифицироваться. Классическая ПЦР состоит из повторяющихся температурных циклов: 1) разрушение водородных связей между цепями ДНК (93-96 °C), 2) гибридизация праймеров на ДНК (40-75 °C), 3) синтез комплементарных цепей ДНК в результате удлинения праймеров (60-75 °C). В результате повторения циклов, увеличение количества ограниченного праймерами фрагментов ДНК идет в геометрической прогрессии. Экспоненциальное увеличение количества фрагмента ДНК происходит по формуле 2^n , где n число циклов амплификации. Как правило, для получения достаточного для детекции количества ДНК необходимо от 20 до 40 циклов ПЦР. Реакцию проводят в специальных программируемых термостатах, автоматически меняющих температуру реакционной смеси в соответствии с заданной программой [1, 157]. Затем проводят детекцию полученных продуктов

амплификации с помощью гибридизации или электрофореза в полиакриламидном или агарозном геле [1].

В настоящее время существует большое количество коммерческих отечественных и зарубежных ПЦР тест – систем для выявления ДНК *M.hominis*, *M.genitalium*, *U.urealyticum* и *U.parvum*. Наиболее доступными являются отечественные зарегистрированные ПЦР тест-системы производства ЦНИИЭ (Москва): «АмплиСенс® *Mycoplasma genitalium*-FL» (ФСР 2007/00580), «АмплиСенс® Флороценоз/Микоплазмы-FL. Одновременное выявление и количественное определение ДНК *U.parvum*, *U.urealyticum* и *M.hominis*» (ФСР2012/13535), "АмплиСенс® *Mycoplasma hominis*-FL" (ФСР 2009/06559), АмплиСенс *U. parvum/U. urealyticum*-FL (ФСР 2011/10381), «АмплиСенс® *U.parvum/U.urealyticum/M.hominis*-скрин-титр-FL. Одновременное выявление и количественное определение ДНК *Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis*» (ФСР 2012/13542); производства ООО НПФ «ЛИТЕХ» (Москва): «ПОЛИМИК 2» (ФСР 2008/03730), «ПОЛИМИК-Мк» (ФСР 2007/01266), «ПОЛИМИК-Ур» (ФСР 2007/01265), «УРЕАПОЛ» (ФСР 2012/13814), а также производства ООО «НПО ДНК-Технология» (Москва): «ПЛАЗМОГЕН-Мх. *Mycoplasma hominis*» (ФСР 2008/02551), «ПЛАЗМОГЕН-Мг. *Mycoplasma genitalium*» (ФСР 2008/02550), ПЛАЗМОГЕН-УП. *Ureaplasma urealyticum* – *Ureaplasma parvum* (ФСР 2009/04072). В качестве участков для амплификации – мишеней используются, как правило, ген уреазы, гены 16S рибосомальных РНК и рибосомальные ДНК.

Коммерческие ПЦР тест-системы, основанные на детекции продуктов амплификации методом электрофореза в агарозном геле, позволяют выявлять отдельно виды *U.urealyticum* и *U.parvum*, но не позволяют определить титр бактериального агента в исследуемом образце. Эффективность ПЦР-детекции микоплазм и уреаплазм в клиническом материале на 10 – 20% выше по сравнению с микробиологическим методом. Это обусловлено, с одной стороны, более высокой чувствительностью (96%), а с другой, возможностью

ПЦР выявлять очень низкие концентрации и некультивируемые формы микроорганизмов [1, 16, 17, 81].

Разработка технологии ПЦР в реальном времени (Real-time PCR) является важным достижением последних лет [1, 23, 157]. Преимуществами «ПЦР в реальном времени» являются: количественная оценка инфекционного агента в клиническом образце, отсутствие контаминации продуктами амплификации реактивов и анализируемого материала, снижение трудоемкости и уменьшение продолжительности исследования, автоматизация процесса, возможность определения нескольких инфекционных агентов в пробе с помощью мультиплексных тест-систем. Следует отметить, что учет и обработку данных результатов ПЦР – РВ осуществляют с помощью компьютерного программного обеспечения. Это позволяет исключить субъективные ошибки при анализе результатов.

4.4 Микробиологические и молекулярно-генетические методы в исследовании антибиотикорезистентности урогенитальных микоплазм

4.4.1 Микробиологические методы

Для определения антибиотикочувствительности урогенитальных микоплазм чаще всего применяют классические микробиологические методы. Одним из таких методов является диско – диффузионный метод с использованием дисков с антибиотиками, основанный на способности антибактериального препарата диффундировать в питательную среду и ингибировать рост микроорганизмов. Оценку чувствительности проводят путем измерения диаметра зоны ингибирования роста бактерии вокруг диска, содержащего антибиотик. Метод широко используется в лабораторной диагностике, однако, ДДМ - это качественный способ оценки чувствительности, и его недостатком является невозможность количественной оценки минимальной подавляющей концентрации (МПК) антибиотика. Другим, более информативным методом определения чувствительности к антибактериальным препаратам микроорганизмов, в том

числе урогенитальных микоплазм считается метод серийных разведений с использованием жидких дифференциально-диагностических питательных сред, который позволяет определить минимальную концентрацию антибиотика, ингибирующего рост микроорганизмов [16, 18, 57, 58, 70, 75, 81].

Основными отечественными разработчиками и производителями питательных сред являются Клиника акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева Первого МГМУ им И.М. Сеченова, Санкт-Петербургский НИИ эпидемиологии и микробиологии имени Пастера, ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, ТОО «Диагност» на базе Омского НИИ природно-очаговых инфекций. Разработаны отечественные наборы для определения спектра резистентности микоплазм и уреаплазм «МИКОПЛАЗМА-АЧ», «УРЕАПЛАЗМА-АЧ», «УРЕА/МИКО-СКРИН-АЧ» (Санкт-Петербургский НИИЭМ им. Пастера, РУ № ФСР 2008/03366) и зарубежные наборы – «MYCOFAST Evolution 3» компании «EliTech»; «Mycoplasma IST 2» компании «BioMerieux» [187]. При помощи микробиологических методов определения антибиотикочувствительности урогенитальных микоплазм можно судить о наличии или отсутствии устойчивости к различным лекарственным препаратам.

4.4.2 Молекулярно-генетические методы

Молекулярно-генетические методы определения антибиотикорезистентности у микроорганизмов, в том числе урогенитальных микоплазм, основаны на выявлении специфических последовательностей отдельных генов-мишеней антибиотиков в геноме бактерий. Они обладают прецизионной специфичностью, высокой чувствительностью, большой производительностью и скоростью исследования [1, 157].

В настоящее время доступными коммерческими ПЦР тест-системами для определения резистентности к эритромицину и тетрациклинам являются

наборы «ЭРИТРОПОЛ» и «ТЕТРАПОЛ» производства ООО НПФ «Литех» (Москва).

В литературе описаны праймеры, позволяющие определять последовательность интересующих фрагментов или целых генов урогенитальных микоплазм, мутационные изменения которых обуславливают устойчивость к разным группам антибактериальных препаратов, с использованием метода ПЦР. Характеристика нуклеотидных последовательностей праймеров, используемых для получения фрагментов генов-мишеней АБП, представлена в таблице 9.

Таблица 9 - Характеристика нуклеотидных последовательностей праймеров, используемых для получения фрагментов генов-мишеней АБП

Ген-мишень	Нуклеотидные последовательности пар праймеров	Источник
<i>M. hominis</i>		
gyrA	5' TTAACAAGCGATGGTGTTC- 3' (forward) 5' GATAATTTTCTGTCATTGTCTTC- 3' (reverse)	97
gyrB	5'CTTGCTATGAGAAATAGTGG-3' (forward) 5'ACGGTTATTTTCAAACCTTTG-3' (reverse)	96
parC	5' CGTCGGATTTTATATTCAATG -3' (forward) 5' GGTGATTCCTTTAGCACCGTT - 3' (reverse)	108
parE	5' CATCACTTAATTTGGGAAAGT- 3' (forward) 5' -ATTCAATAGTAAGATTTGGCA- 3' (reverse)	96
23S domain V	5' TAACTATAACGGTCCTAAGG 3' (forward) 5' CCGCTTAGATGCTTTCAGCG 3' (reverse)	97
<i>M. genitalium</i>		
gyrA	5' CGTCGTGTTCTTTATGGTGC-3' (forward) 5' ATAACGYGTGCAGCAGGTC-3' (reverse)	151
parC	5' TGGGCTTAAAACCCACCACT-3' (forward) 5' CGGGTTTCTGTGTAACGCAT-3' (reverse)	
23S pPHK	5' TGAAATCCAGGTACGGGTGAAGAC -3' (forward) 5' CGGTCCTCTCGTACTAGAAGCAAAG -3' (reverse) 5' GTGTAACCATCTCTTGACTGTCTCGG -3' (forward) 5' TTCACATCAACAAATCCTTGCGA -3' (reverse)	117
<i>Ureaplasma urealyticum</i>		
gyrA	5' TTGCTGCTTTCGAAAATGG -3' (forward) 5' ACCTGATGGCAAAACACTTGG -3' (reverse)	119
gyrB	5' CCAGGTAAATTAGCTGATTG -3' (forward) 5' TTCGAATATGGCTACCATC - 3' (reverse)	
parC	5' ATGCCATGAGCGAATTAGG - 3' (forward) 5' CACTATCATCAAAGTTTGGAC -3' (reverse)	
parE	5' CGTGCTCGTGAAGAACTAA -3' (forward) 5' AAATTCAGCACCAATTCCTGT -3' (reverse)	

<i>Ureaplasma parvum</i>		
gyrA	5' TTGCTGCTTTTCGAAAATGG - 3` (forward) 5' ACCTGA TGGCAAAACACTTGG - 3' (reverse)	119
gyrB	5' CCAGGTAAATT AGCTGATTG - 3` (forward) 5' TTCGAATATGGCTACCATC - 3' (reverse)	
parC	5' ATGCCATGAGCGAATTAGG - 3` (forward) 5' CACTATCATCAAAGTTTGGAC - 3' (reverse)	
parE	5' GCAATTGTTGCACGAGATGCT -3` (forward) 5' TGCCATTTTCAATTAATGGACGCA - 3' (reverse)	
<i>M. hominis, M. genitalium, U.urealyticum, U.parvum</i>		
tet-M	5'- AGTTCCACCGAATCCTTTCTGGGCTTC-3'(forward) 5'- TTCTTGAATACACCGAGCAGGGATTTCTCC-3'(reverse)	104

Результаты исследований, направленных на поиск детерминант антибиотикорезистентности возбудителя могут быть использованы при выборе рациональной схемы лечения ВЗОМТ.

Следует отметить, что при определении механизма антибактериальной устойчивости необходимо выявлять не только присутствие определенных генов-мишеней в геноме микоплазм и уреаплазм, но и наличие в них аминокислотных замен.

Точечные мутации нуклеотидной последовательности не всегда приводят к аминокислотным заменам, поэтому для установления природы антибиотикорезистентности *M.hominis*, *M.genitalium*, *U.urealyticum*, *U.parvum* необходимо проводить анализ аминокислотной последовательности с применением технологии секвенирования [2, 28, 115, 120, 122, 149, 190, 212].

Следует отметить, что в настоящее время доступными коммерческими ПЦР тест-системами для определения резистентности к эритромицину и тетрациклинам *Ureaplasma spp.* и *M.hominis* являются наборы «ЭРИТРОПОЛ» и «ТЕТРАПОЛ» производства ООО НПФ «Литех» (Москва).

4.4.3 Выявление tetM детерминанты резистентности

Для определения устойчивости изолятов урогенитальных микоплазм к препаратам тетрациклинового ряда проводят выявление tet-M детерминанты резистентности. Выявление детерминанты проводят с применением как

классической полимеразной цепной реакцией (ПЦР) с электрофоретическим форматом детекции, так и с использованием секвенирования. Положительный результат амплификации фрагмента tet-M детерминанты свидетельствует об устойчивости изолятов урогенитальных микоплазм к препаратам группы тетрациклинов, отсутствие данного фрагмента – о чувствительности штаммов к данным препаратам [86, 87, 121, 129, 159, 174].

4.4.4 Выявление детерминант резистентности к макролидам и фторхинолонам

Для обнаружения генов-мишеней и мутаций в них, ответственных за возникновение резистентности урогенитальных микоплазм к макролидам и фторхинолонам, широко используется метод ПЦР (ПЦР-РВ) [130, 132, 133, 135, 192]. На первом этапе проводится амплификация целевого гена со специфичными для него праймерами. На втором этапе проводится расшифровка и поиск нуклеотидных замен в генах, ответственных за формирование устойчивости к тем или иным антибактериальным препаратам с использованием технологии секвенирования. В зависимости от цели исследования, секвенируют как отдельные гены и их фрагменты, так и целые геномы бактерий. В настоящее время, для определения мутаций в генах, кодирующих ДНК гиразу (*gyrA*, *gyrB*), топоизомеразу (*parC*, *parE*), рибосомные белки L22, L4, а также 23S рРНК применяется метод ПЦР-РВ, а именно ПЦР-РВ с эффектом гашения зонда праймером и ПЦР-РВ с использованием модифицированных LNA-зондов. Методика мультиплексной ПЦР-РВ с эффектом гашения флуоресценции зонда праймером основана на эффекте переноса энергии флуоресценции между одним из праймеров и зондом [Патент на изобретение № 2451086, Эйдельштейн М.В. с соавт., 2012г.]. Метод ПЦР-РВ с применением модифицированных LNA (locked nucleic acid) - зондов основан на блокировке рибозы в N-конформации и увеличении термодинамической стабильности дуплекса ДНК - LNA «дикого» типа и нестабильности мутантного типа. Присутствие в ПЦР - смеси LNA-

олигонуклеотида, специфически взаимодействующего с нуклеотидной последовательностью дикого типа, блокируя её амплификацию, приводит к увеличению числа копий мутантного аллеля [135, 192]. Данные технологии позволяют выявлять не только известные, но и неизвестные мутации в области связывания олигонуклеотидных зондов.

Для подтверждения типа и характера замены, образцы ДНК бактерий, несущие мутации, целесообразно дополнительно исследовать методом секвенирования [2].

Метод секвенирования по Сэнгеру получил широкое распространение поскольку позволяет определять нуклеотидную последовательность исследуемой ДНК с высокой точностью и является «золотым стандартом» [115, 212].

Секвенирование по Сэнгеру позволяет получить информацию о всех нуклеотидных заменах интересующего участка генома, в том числе и о мутациях, вызывающих устойчивость к АБП. В основе метода лежит терминирование синтеза цепи ДНК ДНК-полимеразой с помощью дидезоксирибонуклеозид трифосфатов [149].

Развитие современной науки предопределило появление новейших технологий секвенирования, в частности массового параллельного секвенирования (NGS). Принцип метода заключается в возможности параллельного определения последовательностей множества различных нитей ДНК [2, 190]. Полногеномное секвенирование дает исчерпывающую информацию об особенностях всех генов и структуре целого генома бактерий и позволяет определять молекулярные механизмы резистентности, как классические, так и альтернативные.

В настоящее время существует несколько платформ NGS а именно: секвенирование методом гибридного захвата (Illumina) и методом катящегося кольца, когда считывание ДНК происходит с оригинальной копии (MGI) и третье поколение – нанопоровое секвенирование одной молекулы. Каждое из поколений имеет свои преимущества и недостатки, но каждое может быть

использовано в изучении молекулярных механизмов антибиотикорезистентности и патогенности различных бактериальных агентов, в том числе урогенитальных микоплазм. В своей работе с использованием секвенирования на платформе Illumina мы провели комплексную оценку не только механизмов антибактериальной устойчивости к различным классам препаратов, но и смогли охарактеризовать структуру генома клинических изолятов микоплазм и уреаплазм, а также впервые в России осуществили мультилокусное типирование штаммов *Mycoplasma hominis*.

ГЛАВА 5 МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА УРОГЕНИТАЛЬНЫХ МИКОПЛАЗМ, ВЫЯВЛЕННЫХ У РЕПРОДУКТИВНОГО НАСЕЛЕНИЯ Г.НИЖНЕГО НОВГОРОДА

В данной главе представлены результаты многолетнего мониторинга антибиотикорезистентности исследований (18 лет), проведенных на базе лаборатории метагеномики и молекулярной индикации патогенов ФБУН ННИИЭМ им.академика И.Н. Блохиной Роспотребнадзора.

Применение микробиологических методов позволило определить фенотип исследуемых изолятов *M.hominis*, *U.urealyticum* и *U.parvum*, подробные данные приведены в таблицах 10 и 11.

Девять штаммов *M.hominis* проявляли устойчивость к одному или двум антибактериальным препаратам, один штамм (МН1817) был чувствительным ко всем препаратам, включенным в исследование (таблица 10).

Таблица 10 -Характеристика фенотипической устойчивости
клинических изолятов *M. hominis*

Штаммы <i>M. hominis</i>	Наименование антибактериальных препаратов, МПК, мкг/мл						
	DOC	GEN	CLM	OFL	MED	JOZ	CIP
МН45	S<1	S<1	S<0,5	S<1	S<0,5	S<0,5	R,4
МН57	S<1	S<1	S<0,5	S<1	S<0,5	S<0,5	R,4
МН529	S<1	S<1	S<0,5	S<1	R,2	S<0,5	R>4
МН621	S<1	S<1	S<0,5	S<1	R,2	S<0,5	S<1
МН1002	S<1	S<1	S<0,5	R,1	S<0,5	S<0,5	S<1
МН1019	S<1	S<1	S<0,5	S<1	R,2	S<0,5	S<1
МН1817	S<1	S<1	S<0,5	S<1	S<0,5	S<0,5	S<1
МН1861	S<1	S<1	S<0,5	S<1	R,2	S<0,5	S<1
МН1866	S<1	S<1	S<0,5	S<1	S<0,5	S<0,5	R>4
МН1991	S<1	S<1	S<0,5	S<1	R,1	S<0,5	S<1

Примечание: DOC–доксидиклин, CLM–клиндамицин, GEN–гентамицин, OFL–офлоксацин, CIP–ципрофлоксацин, MED–медикамицин, JOZ–джозамицин, S – чувствительные, R – резистентные

Все исследуемые штаммы *U.urealyticum* и *U.parvum* были устойчивы к эритромицину, офлоксацину и ципрофлоксацину. Кроме того, два изолята *U.urealyticum* 445 и *U.parvum* 445a характеризовались азитромицин- и рокситромицин-резистентностью.

Характеристика фенотипической резистентности уреаплазм, включенных в исследование представлена в таблице 11.

Таблица 11 - Характеристика фенотипической резистентности клинических изолятов *Ureaplasma spp.*

Наименование антибактериальных препаратов	МПК антибиотиков, мкг/мл					
	Штаммы <i>U. urealyticum</i>				Штаммы <i>U. parvum</i>	
	УУ445	УУ1000	УУ1051	УП1000a	УП445a	УП1051a
Доксициклин	S<1	S<1	S<1	S<1	S<1	S<1
Эритромицин	R,4	R,4	R,4	R,4	R,4	R,4
Рокситромицин	R,4	S<0,5	S<0,5	S<0,5	R,4	S<0,5
Кларитромицин	S<0,5	S<0,5	S<0,5	S<0,5	S<0,5	S<0,5
Медикамицин	S<0,5	S<0,5	S<0,5	S<0,5	S<0,5	S<0,5
Джозамицин	S<0,5	S<0,5	S<0,5	S<0,5	S<0,5	S<0,5
Азитромицин	R,2	S<1	R,2	S<1	R,2	R,2
Офлоксацин	R,2	R,2	R,2	R,2	R,2	R,2
Ципрофлоксацин	R>4	R>4	R>4	R>4	R>4	R>4

В работе использовали, не только классические микробиологические методы исследования, но и современные молекулярно-генетические, в частности технологию NGS.

Проведено полногеномное секвенирование с использованием платформы Illumina секвенатора MiSeq (США) десяти штаммов *M.hominis*, четырех *U.urealyticum* и двух *U.parvum*. Концентрацию ДНК в образцах определяли с помощью флуориметра Qubit и набора Qubit DNA HS Assay Kit (Invitrogen, США). Подготовку ДНК-библиотеки для секвенирования проводили с использованием набора Nextera XT DNA Sample Preparation Kit

(Illumina, США), в соответствии с инструкцией производителя. Оценку качества подготовленной библиотеки ДНК для секвенирования определяли с использованием автоматизированной системы капиллярного гель - электрофореза QIAxcel Advanced System (QIAGEN, Германия), набора реагентов для быстрого разделения фрагментов ДНК «QIAxcel DNA Fast Analysis Kit (3000)» и программного обеспечения QIAxcel ScreenGel (QIAGEN, Германия). Выравнивание и сборку полученных коротких чтений относительно референс-генома осуществляли с использованием встроенного в секвенатор программного обеспечения Isis version 2.6.2.3.

В качестве референса служили полногеномные последовательности штамма *Mycoplasma hominis* ATCC 23114 (номер GenBank FP236530.1), *Ureaplasma urealyticum* serovar 10 str. ATCC 33699 (номер GenBank NC_011374.1), *Ureaplasma parvum* serovar 3 str. ATCC 700970 (номер GenBank NC_002162.1).

Полученные нуклеотидные последовательности полного генома 16 российских изолятов *M. hominis* (10), *U. urealyticum* (4) и *U. parvum* (2) депонированы в международной базе данных GenBank/EMBL/DDBJ (депонентские номера *M. hominis* M57 - MRAH000000000, *M. hominis* M45 - MRAY000000000, *M. hominis* 529 - QMJZ000000000, *M. hominis* 621 - QNHJ000000000, *M. hominis* 1002 - QNHI000000000, *M. hominis* 1019 - QNNH000000000, *M. hominis* 1991 - QOKP000000000, *M. hominis* 1019 - QOKO000000000, *M. hominis* 1817 - QOKQ000000000, *M. hominis* 1861 - QOKN000000000, *U. parvum* 1051a - QPHK000000000, *U. parvum* 445a - QPHI000000000, *U. urealyticum* 1000 - QOKT000000000, *U. urealyticum* 1051 - QOKU000000000, *U. urealyticum* 1000a - QPHJ000000000, *U. urealyticum* 445 - QZWO000000000).

Результаты аннотирования полных геномов клинических изолятов микоплазм и уреаплазм представлены в таблицах 12 и 13 (Приложение 1, 2). В результате сборки первичных прочтений получены от 36 до 133 контигов для каждого генома. Размеры генома штаммов *M. hominis* варьировали от 0,63

до 0,64 Mb. Количество кодирующих последовательностей варьирует от 537 до 558. ГЦ-состав равен 27,1 – 27,2 %, что соответствует данным, представленным в NCBI Genome, о других представителях вида *M.hominis* (26,8% - 27,4%).

В результате сборки первичных прочтений получены от 212 до 1703 контигов генома *U.urealyticum* и от 704 до 1542 - *U.parvum*. Размеры геномов штаммов *U.urealyticum* варьировали от 0,60 до 0,84 Mb, *U. parvum* от 0,59 до 0,66 Mb. Количество кодирующих последовательностей колебалось в широких пределах от 382 до 507 у *U. parvum* и 379 – 655 у *U.urealyticum*. ГЦ-состав равен 25,9 – 26,4 %, что соответствует данным, представленным в NCBI Genome о других представителях рода *Ureaplasma spp.* (25,6% - 26,2%).

5.1 Механизмы антибиотикорезистентности урогенитальных микоплазм

5.1.1 Генетические детерминанты резистентности

***M.hominis* и *Ureaplasma spp.* к эритромицину и тетрациклинам**

Результаты многолетнего мониторинга фенотипической антибиотикорезистентности нижегородских изолятов урогенитальных микоплазм свидетельствуют об увеличении частоты выявления уреаплазм и микоплазм, характеризующихся устойчивостью к тетрациклинам и макролидам. В связи с этим нами был проведен поиск генетических детерминант резистентности урогенитальных микоплазм, ответственных за формирование их резистентности к эритромицину и тетрациклинам с использованием метода классической ПЦР.

Установлена высокая частота обнаружения *tetM* - детерминанты резистентности к препаратам тетрациклинового ряда, как у изолятов уреаплазм (26%), так и у *M.hominis* (28%) (Рисунок 19).



Рисунок 19 - Электрофореграмма продуктов амплификации участка *tetM* - детерминанты, выделенной у клинических изолятов микоплазм и уреаплазм.

Примечание: 1 трек - К— отрицательный контроль, 9 трек- К+ -положительный контроль, содержащий специфический фрагмент ДНК длиной 407 п.о. треки 2, 4, 5 – положительные пробы, содержащие специфический фрагмент ДНК *tetM* детерминанты, выявленной у изолятов *M. hominis*, треки 3,4,5,8 - положительные пробы, содержащие специфический фрагмент ДНК *tetM* детерминанты, выявленной у изолятов *Ureaplasma spp.*

При определении фенотипической устойчивости микоплазм и уреаплазм к тетрациклам частота выявления резистентных форм была ниже и составила 2,5% и 26,1% соответственно. Полученные нами результаты согласуются с данными литературы [121, 129, 159, 174]. Этот феномен объясняется структурными изменениями приобретенной *tetM* - детерминанты, происходящие после ее попадания внутрь бактериальной клетки, что может свидетельствовать о необходимости определенного интервала времени для начала ее функционирования [86, 87].

Устойчивость уреаплазм к макролидам связывают с мутационными изменениями в нескольких генах – мишенях. Такими мишенями являются - V домен гена 23S рРНК, *ermB* – ген и гены, кодирующие рибосомные белки (L4, L22) [130, 203].

С целью определения механизма устойчивости исследуемых изолятов уреаплазм, имеющих эритромицин-резистентный фенотип, был проведен поиск гена *ermB* методом ПЦР (Рисунок 20).



Рисунок 20 - Электрофореграмма продуктов ПЦР участка гена *ermB*, на примере клинических изолятов уреоплазм.

Примечание: трек 7 - К—отрицательный контроль, трек 8 - К+ -положительный контроль, содержащий специфический участок ДНК гена *ermB* длиной 282 п.о. Треки 1,3,4,5 – отрицательные образцы, треки 2 и 6 – положительные образцы *Ureaplasma spp.*

Результаты исследования показали, что в 16% случаев резистентность уреоплазм к эритромицину была обусловлена метилированием 23S рРНК посредством гена *ermB*.

5.1.2 Определение механизмов резистентности *M.hominis* к тетрациклинам с использованием высокопроизводительного секвенирования

Применение современных омиксных технологий позволяет анализировать всю совокупность генов, в том числе и присутствие различных мобильных элементов, которые участвуют как в классических, так и в альтернативных механизмах развития антибактериальной устойчивости клинических изолятов *M.hominis*. Учитывая дискордантность данных между фенотипом и генотипом антибиотикорезистентности, представляло интерес провести поиск детерминант резистентности в геноме 13 изолятов *M.hominis*, чувствительных к препаратам тетрациклинового ряда.

Клинические изоляты МН45, МН57, МН1002, МН1866 проявляли фенотип фторхинолон-резистентности. Изоляты МН621, МН1019, МН1861, МН1991, МН1737 фенотипически характеризовались устойчивостью к

макролидам. *M.hominis* MH529 был одновременно устойчив к препаратам фторхинолонового ряда и макролидам; *M.hominis* 106М к макролидам и аминогликозидам. Изоляты MH1817 и MH1730 были чувствительны ко всем антибактериальным препаратам.

Основным механизмом устойчивости микоплазм к тетрациклинам является приобретение tetM детерминанты, локализованной, на транспозоне Tn916 [86, 87, 121, 129, 159, 174]. По данным базы CARD 2020 геномы изолятов *M.hominis* (M45, M57, MH1002, MH1817, MH1861, MH529, MH621, MH1019, MH1991, MH1866) не содержат последовательностей tetM детерминанты и/или транспозона Tn916.

Другим механизмом, ассоциированным с устойчивостью *M.hominis* к тетрациклинам, является возникновение множественных мутаций в 16S рРНК, что способствует нарушению конформации сайта связывания тетрациклинов [10, 84, 100].

Сравнительный анализ последовательностей 16SpРНК, исследуемых изолятов *M.hominis* относительно эталонного штамма (номер GenBank FP236530.1) выявил различия у трех штаммов микоплазм. Так, у макролид-резистентного изолята MH1861 определено 19 нуклеотидных замен (Рисунок 21) у фторхинолон-резистентных штаммов MH1002 и MH57 по одной замене.

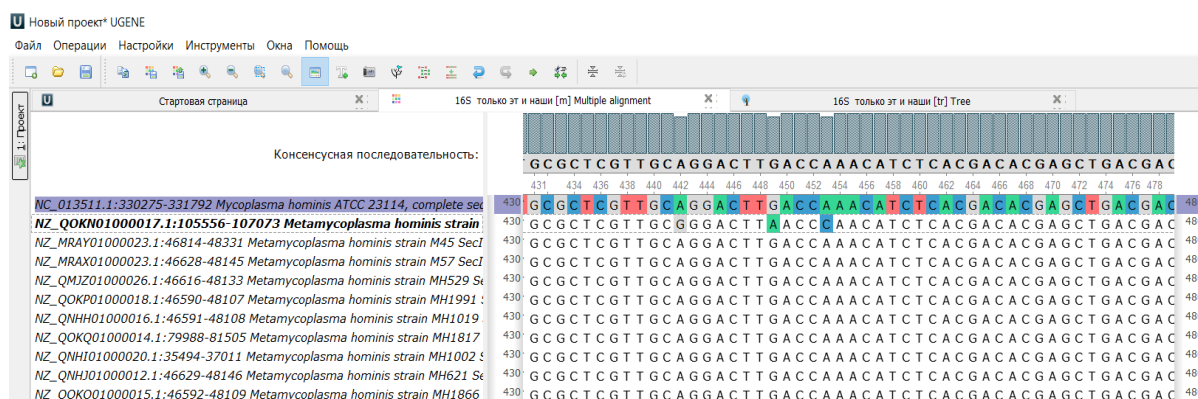


Рисунок 21 - Выравнивание последовательностей 16SpРНК, исследуемых изолятов *M.hominis* относительно эталонного штамма *M.hominis* ATCC 23114 (номер GenBank FP236530.1)

С целью определения эволюционной близости 16SpPHK бактерий с уже установленной резистентностью к препаратам тетрациклинового ряда и исследуемых изолятов *M.hominis*, проведен их филогенетический анализ с британским штаммом *M.hominis* MH10-15 и штаммом *Salmonella enteritica* MFDS10004024 (Рисунок 22).

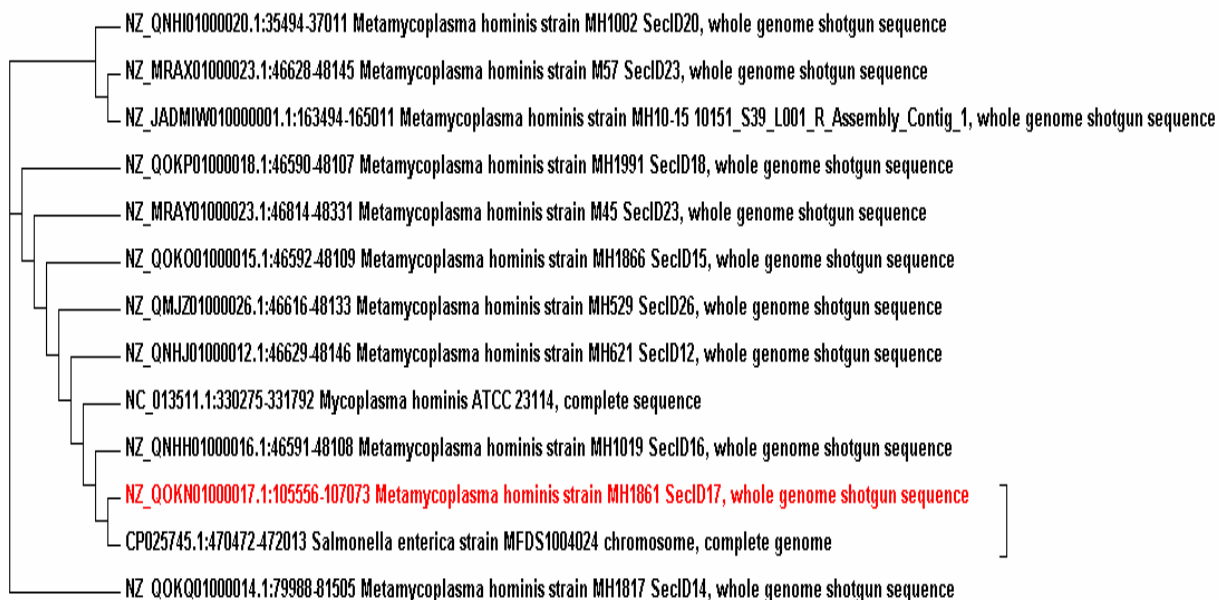


Рисунок 22 – Филогенетическое дерево, построенное с помощью программного обеспечения UGENE Unipro [176] и MEGA7.0 [177] по аннотированным в GeneBank/NCBI последовательностям 16S рPHK штаммов *M. hominis* MH45, MH57, MH529, MH621, MH1002, MH1019, MH1817, MH1861, MH1866, MH1991, MH10-15, *Salmonella enteritica* MFDS10004024

Результаты филогенетического анализа 16SpPHK показали высокий уровень гомологии последовательностей 16SpPHK исследуемых изолятов *M.hominis* и эталонного штамма (номер GenBank FP236530.1). Однако, последовательность 16SpPHK изолята *M.hominis* MH1861 занимает обособленное положение относительно исследуемой группы микоплазм, выделена в отдельную филогенетическую ветвь и ближе всего расположена к 16S рPHK штамма *Salmonella enteritica* MFDS10004024 (номер GenBank CP025745.1), характеризующегося устойчивостью к препаратам

тетрациклинового ряда. Конформация сайта связывания тетрациклинов с рибосомой за счет множественных однонуклеотидных замен в последовательности 16SpPHK клинического изолята *M. hominis* МН1861, а также филогенетически близкое расположение с 16SpPHK тетрациклин-резистентного штамма *Salmonella enteritica* MFDS10004024, вероятно, свидетельствуют о генетически детерминированной устойчивости этого изолята к препаратам тетрациклинового ряда.

5.1.3 Генетические детерминанты резистентности *M.genitalium* к макролидам и фторхинолонам

Наряду с *U.urealyticum*, *U.parvum* и *M.hominis*, представляло интерес провести исследование генетических детерминант резистентности у *Mycoplasma genitalium*. В настоящее время *M. genitalium* относятся к группе патогенных микроорганизмов, этиологическая роль которых в развитии воспалительных заболеваний органов мочеполовой системы является доказанной. Однако, учитывая низкую частоту выявления (не более 3%) и трудности культивирования на питательных средах *M.genitalium*, мы сочли целесообразным использовать молекулярно-генетические методы при изучении их антибиотикорезистентности.

Работы по определению резистентности штаммов *M.genitalium* осуществляли в рамках соглашения о научном сотрудничестве совместно с сотрудниками лаборатории молекулярной диагностики НИИ антимикробной химиотерапии (НИИАХ) ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет» МЗ РФ, возглавляемой к.б.н. И.М. Эйдельштейн. В исследование было включено 48 клинических образцов, положительных на наличие ДНК *M. genitalium* выявленные с применением коммерческой тест-системы «АмплиСенс®*Mycoplasma genitalium*-FL» (ЦНИИЭ, Москва) на основе технологии ПЦР с гибридизационно-флуоресцентной детекцией. Выделение и очистку ДНК исследуемых образцов *M. genitalium* проводили с использованием наборов «Ампли-Сенс ДНК-сорб-А» и «Ампли-Сенс ДНК-

сорб-В» (ЦНИИЭ, Москва). Поиск детерминант резистентности к фторхинолонам и макролидам осуществлялся с использованием ПЦР в реальном времени (РВ) с эффектом гашения флуоресценции зонда праймером (Романов А.В. с соавт., патент на изобретение РФ от 27.09.2017г. №2646123 «Способ выявления мутаций, приводящих к резистентности у *Mycoplasma genitalium* и *Mycoplasma pneumoniae* к макролидным антибиотикам»). Амплификацию и анализ кривых плавления зондов проводили с помощью системы Rotor-Gene 6000 (Corbett Research, Австралия) согласно протоколу патентообладателя. Идентификация последовательностей «дикого типа» и мутаций в V домене 23S рРНК, а также QRDR области генов *gyrA*, *parC* проводилась в соответствии с температурой плавления зондов. Секвенирование положительных образцов проводилось с помощью наборов BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit и генетического анализатора ABI Prism[®] 310 (Applied Biosystems, США).

При оценке устойчивости к макролидам установлено, что два штамма *M. genitalium*, включенные в исследование (n=48), в гене 23S рРНК имели точечную замену аденина (A) на гуанин (G) в позиции 2058 (Рисунок 23), другие штаммы (n=46) не имели мутаций в гене 23S рРНК, т.е. имели фенотип «дикого типа».

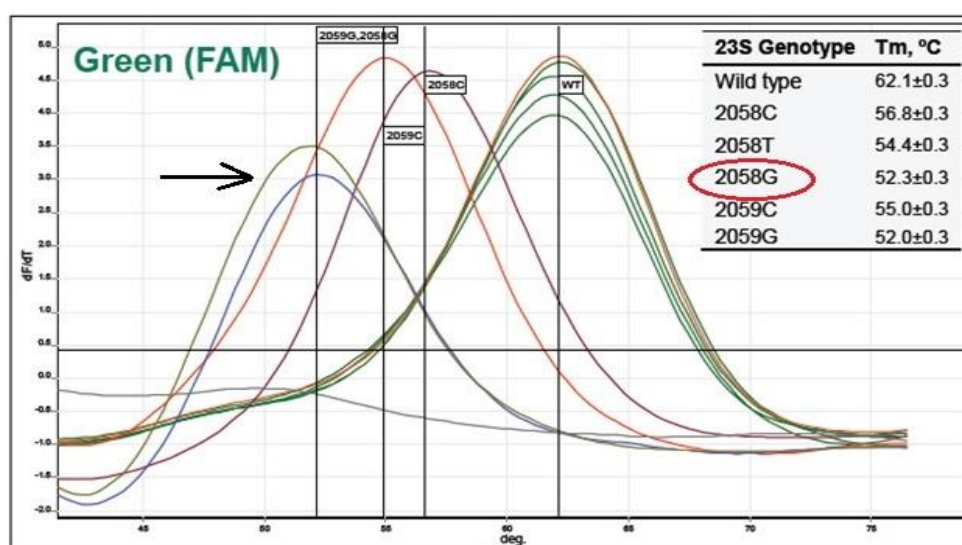


Рисунок 23 - Анализ кривых плавления «дикого типа» (WT) и кривых, содержащих точечные мутации в V домене 23S рРНК [135]

Последующий анализ гена 23S рРНК двух штаммов *M.genitalium* с использованием секвенирования подтвердил наличие однонуклеотидной транзиции аденина (A) на гуанин (G) в позиции 2058 (Рисунок 24).

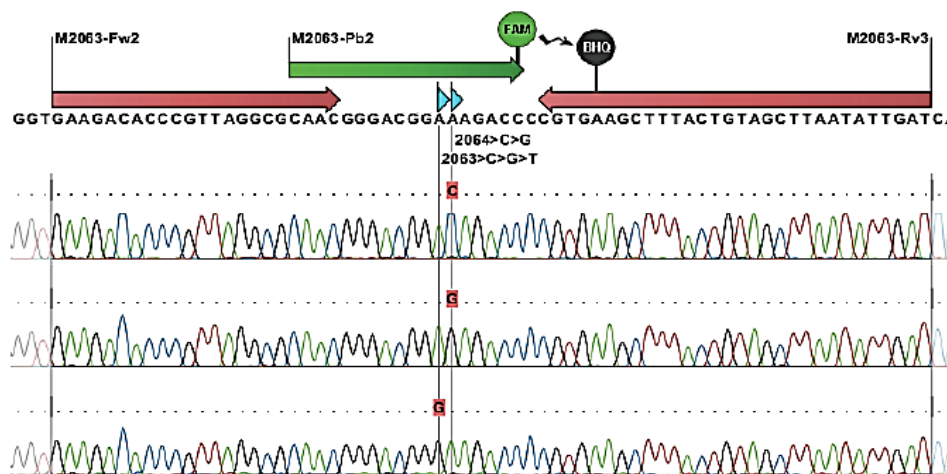


Рисунок 24 - Схематичное выравнивание / диаграмма выравнивания секвенированной части гена 23S рРНК, содержащей однонуклеотидные замены в позициях 2058 и 2059 [135]

Известно, что данная мутация приводит к снижению афинности макролидов с пептидилтрансферазным центром V домена 23S рРНК, и как следствие, возникновению резистентности к данным препаратам у различных представителей грамотрицательных бактерий, включая урогенитальные микоплазмы [190].

Эти же штаммы *M.genitalium* были протестированы на наличие устойчивости к препаратам фторхинолонового ряда. У одного штамма *M.genitalium* была выявлена последовательность QRDR области гена *parC*, отличающаяся от последовательности QRDR области *parC* «дикого типа» в соответствии с профилем плавления зонда. Последующее капиллярное секвенирование гена *parC* *M.genitalium* подтвердило тип однонуклеотидной замены, соответствующей аминокислотной замене - D84Y (замена

аспарагиновой кислоты (D) на тирозин (Y)). Известно, что данная мутация приводит к нарушению связывания фторхинолонов с топоизомеразой IV, и тем самым, к формированию устойчивости к препаратам этой группы [130, 132, 180, 190, 203].

Известно, что частота выявления макролид-резистентных форм *M.genitalium* в Европе является высокой и варьирует от 5 до 25%, в связи с чем в европейских странах проводится обязательное тестирование всех положительных образцов [123, 131, 167, 179, 194, 198, 201, 209]. Однако, в РФ по данным многоцентрового проекта DeMaReS (Detection of Macrolide Resistance) частота обнаружения *M.genitalium*, устойчивых к действию макролидов, составляет лишь 5-6% [49, 105, 135, 190]. Различия в частоте обнаружения макролид-резистентных *M.genitalium*, связана с применением разных схем этиотропной терапии ВЗОМТ. Так, в европейских странах практикуется назначение однократного применения азитромицина, что создает селективное давление на популяцию микроорганизмов и, как следствие, приводит к формированию макролидрезистентных форм. В России препаратом выбора является моксифлоксацин из группы фторхинолонов, макролиды являются препаратами резерва [7, 8, 66, 97, 99, 106].

5.1.4 Характеристика молекулярных механизмов резистентности клинических изолятов *M.hominis* к фторхинолонам (гены *gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*)

Возникновение мутаций в QRDR области генов *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE*, кодирующих большие и малые субъединицы ДНК-гиразы и топоизомеразы IV, являются наиболее распространенным механизмом фторхинолон-резистентности бактерий, в том числе и урогенитальных микоплазм [113 – 115, 117, 118, 153, 154, 191, 192, 214, 215]

Определено, что размеры аминокислотной последовательности генов, кодирующих субъединицы топоизомераз, у исследуемых микоплазм не

отличались, размер гена *gyrA* составил 911 аминокислот, *gyrB* - 648, *parC* - 933, *parE* – 639. Основные различия в изучаемых генах выявлены в количестве нуклеотидных и аминокислотных замен.

Анализ последовательности генов (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, *MATE*, *ABC*) *Mycoplasma hominis* проводили с использованием алгоритма BLAST и пакета программ, представленных на сервере NCBI/PGAP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Выравнивание последовательностей осуществляли с помощью программы CLUSTALX 2.0 (<http://bips.ustrasbg.fr/fr/Documentation/ClustalX/>) [201].

5.1.4.1 Молекулярно-генетическая характеристика гена *gyrA*

Выравнивание белковых последовательностей генов *gyrA* десяти изолятов *M. hominis* с использованием пакета программ BLAST выявило высокий уровень их гомологии.

Основные результаты сопоставления и расшифровки структуры генов *gyrA* и кодирующих белков исследуемых клинических изолятов *Mycoplasma hominis* относительно эталонного штамма *Mycoplasma hominis ATCC 23114* (номер GenBank FP236530.1) представлены в таблице 14.

Таблица 14 - Характеристика гена *gyrA* клинических изолятов *M.hominis*

Изолят	Длина нук-ной послед-ти	Длина амино-й последовате-льности	Кол-во мутаций	Кол-во замен	Позиция и замены аминокислот
1	2	3	4	5	6
МН45	2736	911	48	4	65 аргинин (R) - лизин (K) 525 лизин (K) - аргинин (R) 871 аспарагин (N) – серин (S) 903 глут.к-та (E) - лизин (K)
МН57	2736	911	37	4	65 аргинин(R) - лизин(K) 443 аргинин(R) - серин(S) 747аспар.к-та(D)- аспарагин(N) 903 изолейцин (I)- лизин(K)

МН529	2736	911	49	4	65 аргинин (R) - лизин (K) 458 аспарагин (N) – серин (S) 871 аспарагин (N) – серин (S) 903 глут.к-та (E) - лизин (K)
МН621	2736	911	34	2	65 аргинин (R) - лизин (K) 647 треонин (T) – аланин (A)
МН1002	2736	911	48	4	65 аргинин (R) - лизин (K) 525 лизин (K) - аргинин (R) 871 аспарагин (N) – серин (S) 903 глут.к-та (E) - лизин (K)
МН1019	2736	911	26	4	65 аргинин (R) - лизин (K) 525 лизин (K) - аргинин (R) 871 аспарагин (N) – серин (S) 903 глут.к-та (E) - лизин (K)
МН1817	2736	911	61	4	65 аргинин (R) - лизин (K) 79 лизин (K) - аргинин (R) 871 аспарагин (N) – серин (S) 903 глут.к-та (E) - лизин (K)
МН1861	2736	911	52	4	65 аргинин (R) - лизин (K) 764 изолейцин (I) – лейцин (L) 871 аспарагин (N) – серин (S) 903 глут.к-та (E) - лизин (K)
МН1866	2736	911	47	3	65 аргинин (R) - лизин (K) 871 аспарагин (N) – серин (S) 903 глут.к-та (E) - лизин (K)
МН1991	2736	911	45	6	65 аргинин (R) - лизин (K) 767 валин (V) - изолейцин (I) 525 лизин (K) - аргинин (R) 871 аспарагин (N) – серин (S) 873 валин (V) - изолейцин (I) 903 глут.к-та (E) - лизин (K)

Как свидетельствуют данные, представленные в таблице 14, у всех исследуемых изолятов *M. hominis* выявлена аминокислотная замена аргинина (R) на лизин (K) в 65 позиции N – терминального участка гена *gugA*. Следует отметить, что замена лизина (K) на аргинин (R) в 79 позиции консервативного участка *gugA* обнаружена лишь у изолята МН1817. Большинство мутационных изменений, затрагивающих кодоны аминокислот, встречались в С домene в позициях: 443 и 747 у *M.hominis* М57, 458 - *M.hominis* 529, 647- *M. hominis* 621, 764 - *M.hominis* 1861, 767 - *M.hominis* 1991, 873 - *M.hominis* 1991. Самые распространенные аминокислотные замены в гене *gugA* у всех клинических изолятов *M.hominis* были в 525, 871 и

903 положении (525K→R, 871N→S и 903E→K). Полученные результаты подтверждают высокую степень консервативности N-терминальных регионов гена *gyrA* у различных клинических изолятов *M.hominis* и согласуются с данными литературы [114, 115, 117, 118, 153, 154].

Обнаруженные множественные мутационные изменения в полной последовательности гена *gyrA* исследуемых клинических изолятов *M.hominis* свидетельствуют о высоком уровне их видового полиморфизма. По данным литературы, отсутствие корректирующей 3'→5' экзонуклеазной активности ДНК полимеразы III является одной из причин такой генетической вариабельности *Mycoplasma hominis* [11, 61, 67].

В QRDR области (с 67 по 106 позицию) гена *gyrA* у двух культур *Mycoplasma hominis* МН45 и МН57, характеризующихся устойчивостью к ципрофлоксацину, обнаружена мутация, приводящая к аминокислотной замене серина (S) на лейцин (L) в 83 позиции. Данная замена ранее описана у ципрофлоксацин-резистентных штаммов *E. coli* [214, 215]. У остальных 8 штаммов, мутационные изменения не затрагивают «горячие точки» QRDR области гена *gyrA*.

5.1.4.2 Молекулярно - генетическая характеристика гена *gyrB*

Анализ структуры гена *gyrB* *M.hominis* показал меньшую степень генетической вариабельности (Таблица 15).

Таблица 15 - Характеристика гена *gyrB* клинических изолятов *M.hominis*

Изолят	Длина нук-ной послед-ти	Длина аминок-ной последовательности	Кол-во мутаций	Кол-во замен	Позиция и замены аминокислот
1.	2.	3.	4.	5.	6.
МН45	1947	648	29	2	143 лизин (К) - аргинин (R) 313 треонин(Т)–изолейцин (I)
МН57	1947	648	16	2	168 валин(V) – аланин(А) 313 треонин(Т)–изолейцин(I)

MH529	1947	648	4	4	165 фенилаланин(F)–валин (V) 168 валин(V) – аланин(A) 189фенилаланин(F)-аспар.к-та(D) 490 треонин(T)-аланин(A)
MH621	1947	648	20	3	165 фенилаланин(F)–валин (V) 189фенилаланин(F)-аспар.к-та(D) 194 изолейцин(I)- валин(V)
MH1002	1947	648	13	2	165 фенилаланин(F)–валин (V) 189фенилаланин(F)-аспар.к-та(D)
MH1019	1947	648	19	3	165 фенилаланин(F)–валин (V) 189фенилаланин(F)-аспар.к-та(D) 313 треонин (T)–изолейцин(I)
MH1817	1947	648	16	3	165 фенилаланин(F)–валин (V) 189фенилаланин(F)-аспар.к-та(D) 313 треонин(T)–изолейцин(I)
MH1861	1947	648	23	2	165 фенилаланин(F)–валин (V) 189фенилаланин(F)-аспар.к-та(D)
MH1866	1947	648	10	3	155 пролин (P)-серин (S) 165 фенилаланин(F)–валин (V) 189фенилаланин(F)-аспар.к-та(D)
MH1991	1947	648	29	3	165 фенилаланин(F)–валин (V) 189фенилаланин(F)-аспар.к-та(D) 302 аланин(A) - серин (S)

Установлено, что у большинства клинических изолятов микоплазм, аминокислотные замены в *gyrB* наблюдались в позициях 165 и 189. Однако, у штамма *M.hominis* 529 обнаружены 4 аминокислотные замены. Замена треонина (T) на аланин (A) в 490 позиции была выявлена лишь в *gyrB* *M.hominis* 529.

По данным литературы известно, что мутация, приводящая к замене аспарагиновой кислоты (D) на аспарагин (N) в позиции 426 (нумерация по *E.coli*), обуславливает развитие устойчивости к препаратам фторхинолонового ряда [214, 215]. Анализ полных аминокислотных последовательностей гена *gyrB* исследуемых изолятов микоплазм и

эталонного штамма (номер GenBank FP236530.1), показал, что в позиции 426, как у эталонного, так и у исследуемых штаммов исходно содержится аспарагин (Рисунок 25).

WP_025670540.1 DNA gyrase subunit B [Escherichia coli]
 Icl|Query_227209



Рисунок 25 - Выравнивание аминокислотной последовательности гена *gyrB* исследуемых изолятов *M. hominis* относительно *gyrB* штамма *E. coli* K-12. Замена D426N выделена зеленым цветом

Других значимых мутационных изменений, приводящих к формированию резистентности к фторхинолонам, в гене *gyrB* исследуемых изолятов *M. hominis*, нами не выявлено.

5.1.4.3 Молекулярно - генетическая характеристика гена *parC*

Анализ последовательности гена *parC* исследуемых клинических изолятов микоплазм позволил обнаружить большое количество мутаций по сравнению с эталонным штаммом (FP236530.1) (Таблица 16). Следует отметить, что число мутационных изменений в гене *parC* было наибольшим среди генов *gyrA*, *gyrB* и *parE*, кодирующих субъединицы топоизомераз.

Таблица 16 - Характеристика гена *parC* у изолятов *M.hominis*

Изолят	Длина нук-ной послед-ти	Длина амино-й последовательности	Кол-во мутаций	Кол-во замен	Позиция и замены аминокислот
МН45	2802	933	44	8	542 серин (S) - аспарагин (N) 632 валин (V) - изолейцин (I) 649 метионин (M)-изолейцин (I) 666 аспарагин (N) - серин (S) 743 серин (S) – лейцин (L) 827 валин (V) – аланин (A) 828 аспар.к-та (D)-аспарагин (N) 862 глутамин (Q)-глут.к-та (E)
МН57	2802	933	34	8	144 лизин(K) – аргинин(R) 616 аспарагин (N) – серин (S) 623 метионин (M)-изолейцин (I) 633 валин (V) – изолейцин(I) 743 серин (S) – лейцин (L) 827 валин (V) – аланин (A) 898 аспар.к-та (D)-аспарагин (N) 908 валин (V) – изолейцин (I)
МН529	2802	933	31	6	542 серин (S) - аспарагин (N) 616 аспарагин (N) – серин (S) 632 валин (V) – изолейцин (I) 743 серин (S) – лейцин (L) 827 валин (V) – аланин (A)
МН621	2802	933	36	5	616 аспарагин (N) – серин (S) 632 валин (V) – изолейцин (I) 743 серин (S) – лейцин (L) 768 треонин (T) - аланин (A) 827 валин (V) – аланин (A)
МН1002	2802	933	40	8	144 лизин (K) – аргинин(R) 339 серин (S) - треонин(T) 542 серин (S) - аспарагин (N) 616 аспарагин (N) – серин (S) 623 гистидин (H)-изолейцин (I) 743 серин (S) – лейцин (L) 827 валин (V) – аланин (A) 828 аспар.к-та (D)-аспарагин (N)
МН1019	2802	933	47	5	144 лизин (K) – аргинин (R) 616 аспарагин (N) – серин (S) 743 серин (S) – лейцин (L) 786 глут.к-та (E) – лизин (K) 827 валин (V) – аланин (A) 894 аспар.к-та (D)-глицин (G)
МН1817	2802	933	41	7	144 лизин (K) – аргинин (R) 542 серин (S) - аспарагин (N) 616 аспарагин (N) – серин (S) 743 серин (S) – лейцин (L) 827 валин (V) – аланин (A)

Изолят	Длина нук-ной послед-ти	Длина амино-й последовательности	Кол-во мутаций	Кол-во замен	Позиция и замены аминокислот
					828 аспар.к-та (D)-аспарагин (N) 862 глутамин (Q)-глут.к-та (E)
MH1861	1947	648	28	6	524 лизин (K) – аргинин (R) 542 серин (S) - аспарагин (N) 616 аспарагин (N) – серин (S) 743 серин (S) – лейцин (L) 827 валин (V) – аланин (A) 894 аспар.к-та(D)-глицин (G)
MH1866	1947	648	45	7	144 лизин (K) – аргинин (R) 542 серин (S) - аспарагин (N) 616 аспарагин (N) – серин (S) 743 серин (S) – лейцин (L) 768 треонин (T) - аланин (A) 827 валин (V) – аланин (A) 862 глутамин (Q)-глут.к-та (E)
MH1991	1947	648	35	6	542 серин (S) - аспарагин (N) 616 аспарагин (N) – серин (S) 743 серин (S) – лейцин (L) 827 валин (V) – аланин (A) 861 аспарагин (N)-аспар.к-та(D) 886 пролин (P) - лейцин (L)

Примечание: наиболее часто встречающиеся аминокислотные замены выделены черным цветом

Наиболее часто встречающиеся замены обнаружены в позициях 542, 616, 743, 827, 828 гена *parC*. Определено, что у всех исследуемых изолятов *M.hominis* выявлены аминокислотные замены в позициях 743 и 827. Замена аспарагина (N) на серин (S) в 616 позиции выявлена у 9 штаммов микоплазм, за исключением *M.hominis* MH45.

По данным литературы, мутация, приводящая к изменению 144 (134 по *E.coli*) кодона лизин (K) → аргинин (R), в гене *parC* определяет возникновение у различных бактерий (*Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, *Escherichia coli* и др.), в том числе и *M.hominis*, устойчивости к фторхинолонам [151, 152, 214, 215].

Результаты выравнивания аминокислотной последовательности гена *parC* исследуемых клинических изолятов микоплазм относительно эталонного штамма позволили выявить выше описанную замену K144R у

четырех, исследуемых штаммов *M.hominis* (MH1002, MH1019, MH1817, MH1866) (Рисунок 26).

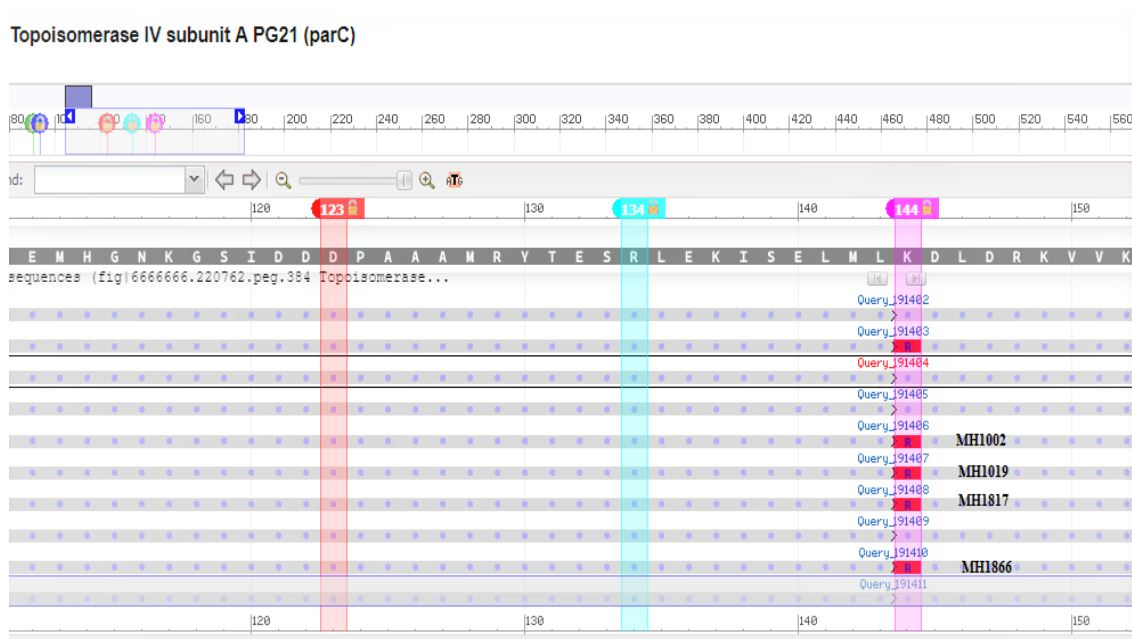


Рисунок 26 - Выравнивание аминокислотных последовательностей генов parC исследуемых изолятов *M.hominis* относительно эталонного штамма. Выделена замена K144R.

Следует отметить, что у двух клинических изолятов *M.hominis* (MH1019, MH1817) фенотипическая резистентность к фторхинолонам не обнаружена. Вероятно, это связано с низкой экспрессией гена parC.

5.1.4.4 Молекулярно - генетическая характеристика гена parE

Анализ последовательности гена parE у всех исследуемых изолятов *M. hominis* выявил аминокислотную замену - лизина (K) на аргинин (R) в 387 позиции (Таблица 17).

Таблица 17 - Характеристика гена *parE* у изолятов *M.hominis*

Изолят	Длина нукл. посл-ти	Длина амин-ной посл-ти	Кол-во мутаций	Кол-во замен	Позиция и замены аминокислот
МН45	1920	639	14	2	387 лизин (K) - аргинин (R) 546 лейцин(L)- фенилаланин(F)
МН57	1920	639	16	1	387 лизин (K) – аргинин (R)
МН529	1920	639	22	2	387 лизин (K) - аргинин (R) 417 валин (V) – изолейцин(I)
МН621	1920	639	28	3	151 глут.к-та (E) - лизин(K) 387 лизин (K) - аргинин (R) 417 валин (V) – изолейцин(I)
МН1002	1920	639	28	3	387 лизин (K) - аргинин (R) 417 валин (V) – изолейцин(I) 468 аланин (A)- валин (V)
МН1019	1920	639	20	2	387 лизин (K) - аргинин (R) 417 валин (V) – изолейцин(I)
МН1817	1920	639	25	3	281 треонин (T) - изолейцин(I) 387 лизин (K) - аргинин (R) 817 валин (V) – изолейцин(I)
МН1861	1920	639	29	3	208 треонин (T) - изолейцин(I) 387 лизин (K) - аргинин (R) 817 валин (V) – изолейцин(I)
МН1866	1920	639	19	1	387 лизин (K) - аргинин (R)
МН1991	1920	639	31	3	144 фенилаланин(F)- лейцин(L) 387 лизин (K) - аргинин (R) 417 валин (V) – изолейцин(I)

Следует отметить, что общее число мутационных замен в гене *parE* было вдвое меньше по сравнению с генами *parC*, *gyrA*, *gyrB*.

У всех штаммов *M.hominis*, включенных в исследование, аминокислотных замен в QRDR области гена *parE*, ассоциированных с формированием устойчивости к фторхинолонам, не обнаружено.

Клинический изолят *M.hominis* 529 имел ципрофлоксацин-резистентный фенотип, но мутационных изменений в QRDR области генов-мишеней топоизомераз не обнаружено. Вероятно, фторхинолон-резистентность данного изолята обусловлена альтернативным механизмом

устойчивости, таким как, активное выведение антибиотика из клетки посредством ABC транспортеров.

5.1.5 Молекулярно-генетическая характеристика эффлюксных систем клинических изолятов *Mycoplasma hominis*

Эффлюкс системы, относящиеся к семействам ABC-транспортеров (ATP Binding Cassette), RND (Resistance-Nodulation Division), MFS (Major Facilitator Superfamily), SMR (Small Multidrug Resistance) и MATE (Multidrug and Toxin Extrusion), играют важную роль в возникновении множественной лекарственной резистентности у многих видов грамположительных и грамотрицательных бактерий. Поиск и молекулярная характеристика природы и особенностей эффлюкс систем бактерий, в том числе *Mycoplasma hominis*, крайне затруднительна при использовании классических микробиологических методов исследования. С появлением и широким использованием в научных исследованиях современных молекулярно-генетических методов, включая высокопроизводительное секвенирование (NGS), стало возможным глубокое изучение структурной организации бактериальных геномов, включая детальное исследование эффлюксных систем.

Аннотирование полных геномных последовательностей клинических изолятов *M.hominis* (MH45, MH57, MH529, MH621, MH1002, MH1019, MH1817, MH1861, MH1866, MH1991), позволило выявить присутствие генов эффлюксной системы ABC - транспортеров (ATP-binding cassette superfamily) у анализируемых микоплазм. Известно, что эффлюксные системы ABC-транспортеров являются эволюционно консервативными и экспортируют большое количество субстратов значительно различающихся по своей структуре за счет энергии гидролиза АТФ. По данным аннотирования с использованием сервера RAST система ABC-транспортеров исследуемых изолятов *M.hominis* представлена структурными элементами, осуществляющими не только транспорт олигопептидов через мембрану бактериальной клетки, но и выведении лекарственных препаратов из

бактериальной клетки. Это свойство обеспечивает устойчивость бактерий не только к различным классам антибиотиков, но к дезинфицирующим средствам. На сегодняшний день роль эффлюкса в развитии устойчивости к фторхинолонам при помощи ABC-транспортеров является экспериментально доказанной [11, 112, 113, 183]. Система ABC-транспортеров изолятов *M.hominis* представлена тремя копиями гена *oppB* (кодирует транспортные белки – пермеазы ОорВ) и одной копией гена *oppC* (кодирует пермеазу ОорС) (Рисунок 27).

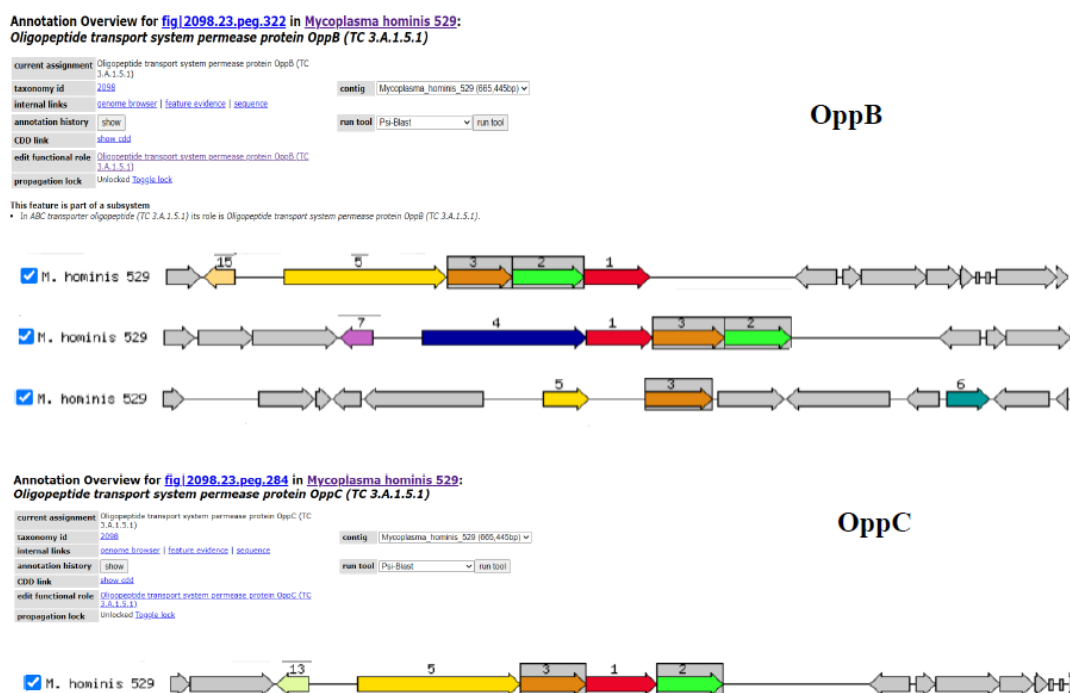


Рисунок 27 - Молекулярно-генетическая характеристика ABC – транспортеров клинических изолятов *Mycoplasma hominis*

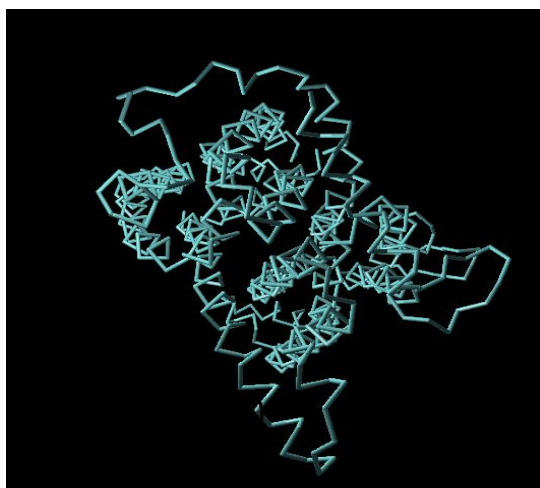
Примечание: Данные, полученные с использованием сервиса Rapid Annotation using Subsystem Technology (RAST)

Выравнивание последовательности генов ABC системы изолятов *M.hominis* показало высокую идентичность (72% - 79%) с аналогичными системами ABC *Mycoplasma genitalium*, *Clostridium botulinum* и представителей стафилококков и лактобацилл. Роль данных белков в возникновении множественной лекарственной резистентности является установленной [134]. Необходимо отметить, что кроме эффлюксной

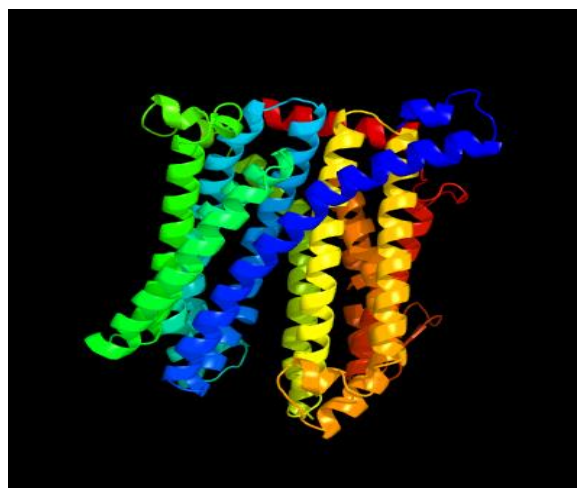
системы, представленной ABC – транспортерами, в геноме всех исследуемых клинических изолятов *M.hominis* обнаружены гены, кодирующие белки эффлюксной системы MATE (Multidrug and toxic compound extrusion family), ответственной за множественную лекарственную устойчивость.

В ходе анализа профиля гена, кодирующего белки семейства MATE выявлено, что длина его нуклеотидной последовательности составила 1809 нуклеотидов, аминокислотной последовательности - 602 аминокислоты. Отмечено, что длина гена, кодирующего белки семейства MATE у изолята MH529 была больше, чем у всех изолятов *M.hominis*, включенных в исследование и составила – 1998 нуклеотидов и 665 аминокислот. Изменения в QRDR области генов *gyrA/gyrB* и *parC/parE* у изолята MH529 не были обнаружены, что, вероятно, свидетельствует об активном выведении антибиотиков из бактериальной клетки посредством эффлюксной системы MATE.

Третичная структура (3D модель) белка MATE клинического изолята MH529 представлена на рисунке 28.



А
Изображение третичной структуры белка MATE (UGENE Unipro 1.31)



Б
Цветное изображение N → C – терминальный конец
Размеры модели (Å): X : 61,839 Y : 63,855 Z : 67,575

Рисунок 28 - Третичное изображение структуры белка системы MATE клинического изолята *M.hominis* MH529.

Примечание: Изображения получены с использованием сервера Phyre2 web portal for protein modeling (А, Б) и программного обеспечения UGENE Unipro 1.31 (А)

Определено, что гены, кодирующие белки семейства MATE у исследуемых изолятов *M.hominis* не относятся к классическим эндогенным насосам системы активного эффлюкса, как например – AcrB у *E.coli*, MexB у *Pseudomonas aeruginosa*, QacA у *Staphylococcus aureus* и PmrA у *Streptococcus pneumonia* [151, 152, 214, 215]. Гены микоплазм, кодирующие MATE, многокомпонентны и содержат в себе неполные гомологичные последовательности двух семейств – MATE_like superfamily (MATE_like 5, 8, 4, 14, 6, MATE_MepA_like, MATE_yoeA_like) и NorM superfamily (vmrA, NorM, matE) (Рисунок 29).

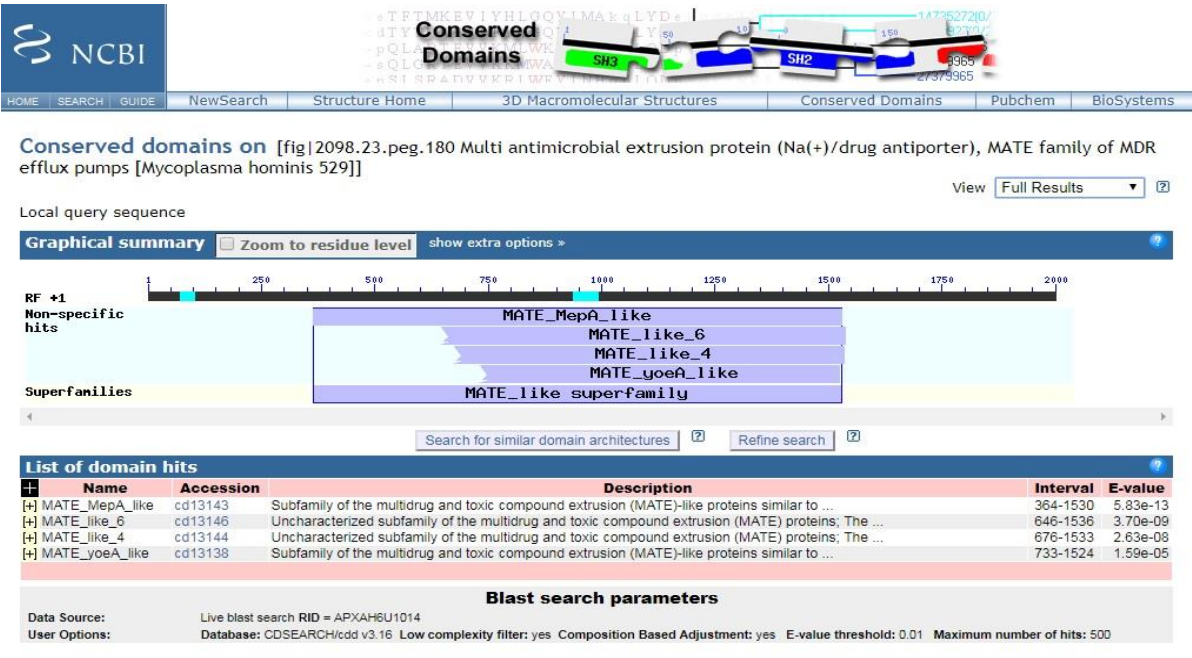


Рисунок 29 - Характеристика структуры генов, кодирующих белки семейства MATE на примере клинического изолята *M.hominis* MH529.

MATE_like – подсемейство белков, подобное интегральным мембранным белкам – MepA *Staphylococcus aureus*, которые участвуют в экспорте метаболитов через клеточную мембрану и ответственны за множественную лекарственную устойчивость (MDR) у многих бактерий. В работах Chen с соав., (2002г.) было доказано на примере *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio vulnificus* и *E.coli*, что гены - vmrA и NorM являются

Na⁺ антипереносчиками лекарственных препаратов в составе эффлюксной системы MATE, и так же как белки МерА ассоциированы с множественной резистентностью [151, 151, 195, 214].

Сравнительный анализ последовательности генов, кодирующих белки семейства MATE десяти изолятов *M.hominis* относительно эталонного штамма (номер GenBank FP236530.1) выявил существенные различия, заключающиеся в количестве нуклеотидных замен (от 30 до 49) (рисунок 29). В то же время точечные мутации, приводящие к изменению кодонов аминокислот, встречались гораздо реже: от одной у *M. hominis* M45 до четырех у *M. hominis* 1817, *M. hominis* 1019, *M. hominis* M57.



Рисунок 29 - Сравнительный анализ последовательности генов, кодирующих белки семейства MATE десяти изолятов *M. hominis* относительно эталонного штамма (номер GenBank FP236530.1)

По данным базы «CARD 2020» гены, кодирующие белки MATE *M.hominis* наиболее схожи с генами, ответственными за множественную лекарственную резистентность, а именно: *cdeA Clostridioides difficile*, *merA Staphylococcus aureus* и *norM Pseudomonas roae*. Ген *merA* кодирует белок МерА, который является частью кластера МерРАВ и участвует в выведении лекарственных препаратов из бактериальной клетки [134, 138, 152].

С целью определения эволюционного происхождения белков системы МАТЕ изолятов *M.hominis* проведен филогенетический анализ родственных связей с наиболее гомологичными белками, ответственными за множественную лекарственную резистентность бактерий других видов (Рисунок 30).



Рисунок 30 - Филогенетическое дерево, построенное с помощью программного обеспечения UGENE Unipro [176] по аннотированным в GeneBank/NCBI последовательностям генов, кодирующих белки семейства МАТЕ штаммов *M. hominis* МН45, МН57, МН529, МН621, МН1002, МН1019, МН1817, МН1861, МН1866, МН1991, *Pseudomonas poae*, *Clostridioides difficile*, *Staphylococcus aureus*.

Результаты филогенетического анализа свидетельствуют о высоком уровне гомологии генов, кодирующих белки МАТЕ, у всех исследуемых штаммов *M.hominis*. Наибольшая степень гомологии генов наблюдается в парах клинических изолятов, образующих друг с другом единые кластеры *M.hominis* 1002 – *M.hominis* 1991, *M.hominis* 1866 – *M.hominis* 621 и *M.hominis* 1019 – *M. hominis* 1861.

Однако, последовательности гена изолятов *M.hominis* М45 и *M.hominis* М57 наиболее отдалены от общей исследуемой группы генов и выделены в отдельную филогенетическую ветвь. У изолята *M.hominis* М45 ген, кодирующий белок системы МАТЕ, филогенетически отдален от

аналогичных генов у других исследуемых микоплазм и ближе расположен к гену *cdeA Clostridioides difficile*, роль которого в развитии фторхинолон-резистентности является установленной. Последовательность генов, кодирующих белки МАТЕ полирезистентного штамма *M.hominis* МН529 и чувствительного ко всем антибиотикам штамма *M.hominis* МН1817 не образуют единых кластеров с другими штаммами, расположены обособленно, но в пределах общей группы исследуемых микоплазм.

Информации, посвященной характеристике эффлюксных систем МАТЕ урогенитальных микоплазм в свободном доступе, отсутствует. Это делает невозможным проведение глубокого сравнительного анализа на данном этапе. Расширение представленности в международной базе данных GenBank генома изолятов *M.hominis*, циркулирующих в разных странах мира, в дальнейшем позволит представить на современном уровне структурную организацию основных типов эффлюксных систем, задействованных в формировании устойчивости к лекарственным препаратам.

5.1.6. Характеристика молекулярных механизмов резистентности клинических изолятов *M.hominis* к макролидам

5.1.6.1 Генетическая характеристика 23S рРНК

Биоинформационный анализ результатов полногеномного секвенирования урогенитальных микоплазм позволил установить, что субъединица 23S рРНК *M.hominis* состоит из двух оперонов *gpnA* и *gpnB*, что ранее было определено Ladefoged и Christiansen [161]. В области III домена 23S рРНК, у всех исследованных изолятов в позиции 1550 выявлена замена оснований С (цитозин) и Т (тимин) в гетерозиготном состоянии. Показано, что размер нуклеотидной последовательности 23S рРНК исследуемых штаммов составил 2895 п.о. Выравнивание полной последовательности гена 23S рРНК исследуемых изолятов относительно последовательности эталонного штамма (номер GenBank FP236530.1) позволило определить, что нуклеотидная последовательность 23S рРНК изолятов *M. hominis* (МН1866 и

МН1991) не отличались от последовательности эталонного штамма. У восьми изолятов *M. hominis* (МН45, МН57, МН529, МН621, МН1002, МН1019, МН1817, МН1861), включенных в исследование, обнаружено от двух до пяти нуклеотидных замен в гене 23S рРНК. Примечательно, что в структуре 23S рРНК МН1861 выявлено 35 мутаций.

Выравнивание нуклеотидной последовательности пептидилтрансферазного центра V домена 23S рРНК показало, что десять, включенных в исследование, изолятов характеризовались заменой G2057A (по *E.coli*), то есть имели генетически закрепленную резистентность к эритромицину. Замена C2610U была описана ранее у макролид-резистентных штаммов *Streptococcus pneumoniae* [130]. Данная замена обнаружена у девяти культур *M. hominis* за исключением изолята *M. hominis* 1861 (Рисунок 31).

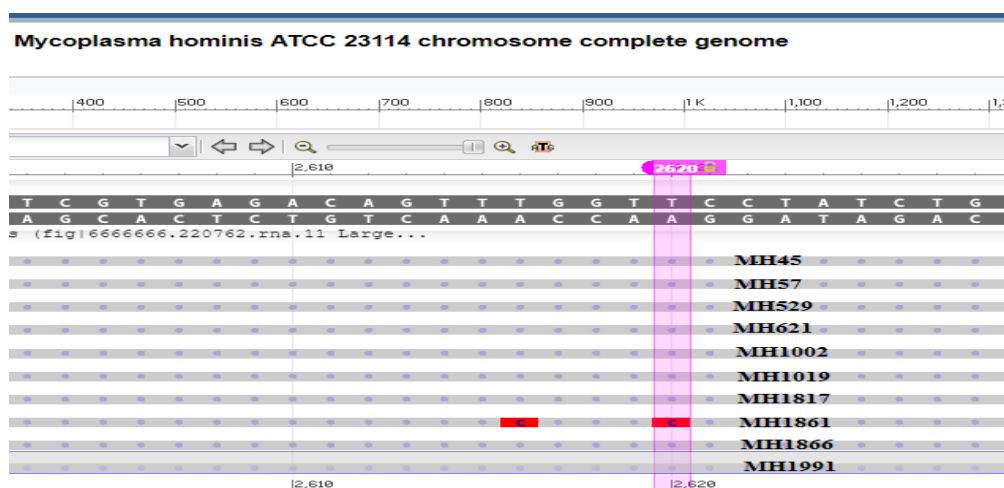


Рисунок 31 - Выравнивание нуклеотидных последовательностей 23S рРНК *M. hominis*. Отсутствие замены C2620U у МН1861 выделено розовым маркером

Мутационные изменения нуклеотидной последовательности центральной петли V домена 23S рРНК в позициях 2058, 2059, 2060 и 2062 (по *E.coli*), играющих ведущую роль в возникновении резистентности у большинства бактерий к представителям группы макролидов, у исследуемых нами клинических изолятов *M. hominis* не обнаружены (Рисунок 32).

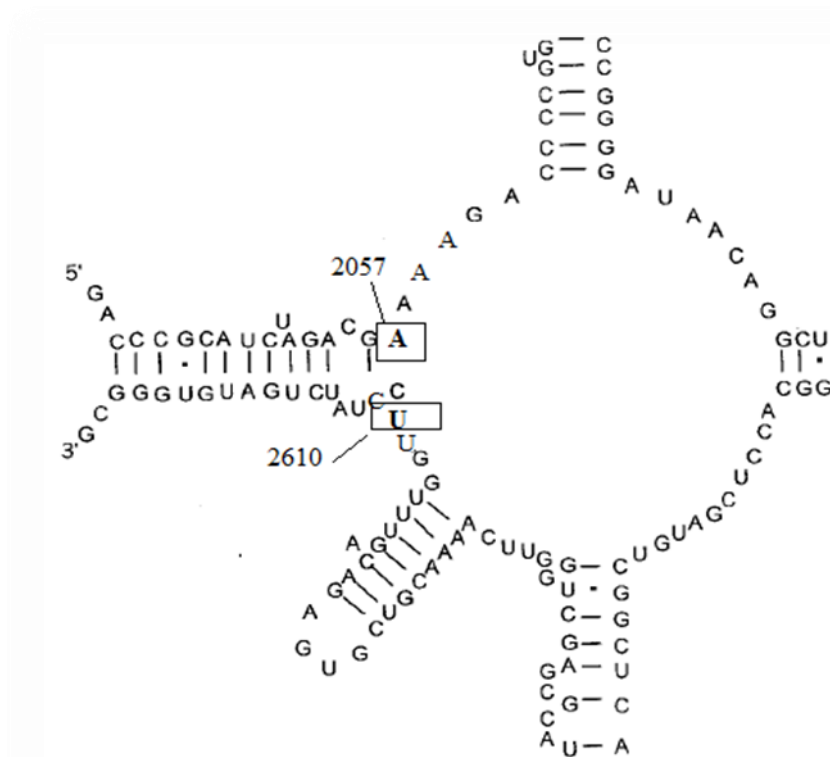


Рисунок 32 - Вторичная структура V домена гена 23S рРНК клинических изолятов *M.hominis*.

Примечание: Получено с использованием сервера <https://www.tbi.univie.ac.at/RNA/>

5.1.6.2 Молекулярно - генетическая характеристика рибосомных белков L22 и L4

Анализ генов, кодирующих рибосомные белки L22 и L4 изолятов *M.hominis*, позволил определить полную нуклеотидную последовательность генов, размер которых составил 966 п.о. и 387 п.о. соответственно. Аминокислотная последовательность гена, рибосомного белка L4 содержит 322 аминокислоты, белка L22 - 129.

Установлено, что у клинических изолятов *M.hominis* 529, *M.hominis* 1002 и *M.hominis* 1866 имеется нуклеотидная замена в 120 кодоне гена (замена валин (V) – изолейцин (I)), кодирующего рибосомный белок L22 (Рисунок 33).

50S ribosomal protein L22 [Mycoplasma hominis]

Sequence ID: [gil502618702|WP_012855569.1](#) Length: 129 Number of Matches: 1

► [See 8 more title\(s\)](#)

Range 1: 1 to 129 [GenPept](#) [Graphics](#)

▼ Next Match ▲ Previous Match

Score	Expect	Identities	Positives	Gaps
249 bits(636)	1e-83	128/129(99%)	129/129(100%)	0/129(0%)
MH529 1	MAKEILQNSAHASVRMQRISPRKARLVADLIRYKSATQAIVILKHTHKKASEIILKLLNS	60		
Sbjct 1	MAKEILQNSAHASVRMQRISPRKARLVADLIRYKSATQAIVILKHTHKKASEIILKLLNS	60		
MH529 61	AIANATNNAGLDATKLYVTTLVNDGPTLKRFQPHSRGRAYAILKRTSHFFIELTEIN	120		
Sbjct 61	AIANATNNAGLDATKLYVTTLVNDGPTLKRFQPHSRGRAYAILKRTSHFFIELTEIN	120		
MH529 121	EEINKKGDK 129			
Sbjct 121	EEINKKGDK 129			

Рисунок 33 - Выравнивание аминокислотной последовательности белка L22 на примере изолята *M.hominis* 529. Выделена замена I120V.

Необходимо отметить, что замена изолейцина на валин в 120 позиции гена, кодирующего белок L22, описана впервые.

Точечных нуклеотидных замен, приводящих к изменению аминокислотного состава гена, кодирующего рибосомный белок L4 клинических изолятов *M.hominis*, не обнаружено.

5.1.7 Характеристика молекулярных механизмов

антибиотикорезистентности клинических изолятов *Ureaplasma ssp.* к препаратам фторхинолонового ряда (гены *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE*)

Определено, что размеры аминокислотной последовательности генов, кодирующих большие и малые субъединицы топоизомераз (*gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE*) исследуемых изолятов *U. parvum* и *U. urealyticum* существенно не отличались (Таблица 18). Основные различия в изучаемых генах выявлены в количестве нуклеотидных и аминокислотных замен.

Анализ последовательности генов (*gyrA*, *gyrB*, *parC*, *parE*, *ABC*) *Ureaplasma urealyticum* и *Ureaplasma parvum* проводили с использованием алгоритма BLAST и пакета программ, представленных на сервере NCBI/PGAP (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast>).

Выравнивание последовательностей осуществляли с помощью программы CLUSTALX 2.0 (<http://bips.ustrasbg.fr/fr/Documentation/ClustalX/>) [201].

Таблица 18 - Характеристика аминокислотной последовательности генов *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE* клинических изолятов *Ureaplasma ssp.*

Изоляты <i>Ureaplasma ssp.</i>	Размер аминокислотной последовательности генов ДНК-гиразы и топоизомеразы IV			
	<i>gyrA</i>	<i>gyrB</i>	<i>parC</i>	<i>parE</i>
<i>U.parvum</i> 445a	840	650	850	642
<i>U.parvum</i> 1051a	840	650	850	642
<i>U.urealyticum</i> 445	844	650	850	642
<i>U.urealyticum</i> 1000	844	650	850	642
<i>U.urealyticum</i> 1000a	844	650	850	642
<i>U.urealyticum</i> 1051	844	650	850	642

5.1.7.1 Молекулярно - генетическая характеристика гена *gyrA*

Выравнивание полной последовательности гена *gyrA* клинического изолятов *U. parvum* относительно репрезентативного штамма *Ureaplasma parvum* serovar 3 str. ATCC 700970 (номер GenBank NC_002162.1) показало их полную идентичность, мутационных изменений не выявлено.

Основные результаты сопоставления и расшифровки структуры генов *gyrA* и кодирующих белков исследуемых изолятов *U. urealyticum* относительно *Ureaplasma urealyticum* serovar 10 str. ATCC 33699 (номер GenBank NC_011374.1) представлены в таблице 19.

Таблица 19 - Характеристика гена *gyrA* клинических изолятов

U.urealyticum

Изолят	Длина нуклеотидной последовательности	Кол-во мутаций	Кол-во замен	Позиция и замены аминокислот
<i>U.urealyticum</i> 445	2523	4	2	468 глут.к-та(Е)- лизин (К) 834 лизин(К)- глутамин(Q)
<i>U.urealyticum</i> 1000	2523	7	3	6 пролин(P) - треонин (Т) 468 глут.к-та(Е)-лизин (К) 834лизин(К)-глутамин(Q)
<i>U.urealyticum</i> 1000a	2523	8	3	6 пролин(P) - треонин (Т) 468 глут.к-та(Е)-лизин (К) 834лизин(К)-глутамин(Q)
<i>U.urealyticum</i> 1051	2523	5	3	217аспарагин(N)-лизин(К) 468 глут.к-та(Е)- лизин (К) 834 лизин(К)- глутамин(Q)

Установлена высокая гомология полных последовательностей гена *gyrA* у изолятов *U.urealyticum*, включенных в исследование и эталонного штамма, в структуре гена выявлено две аминокислотные замены у *U.urealyticum* 445 и три замены у штаммов *U.urealyticum* 1000, *U.urealyticum* 1000a и *U.urealyticum* 1051.

При анализе профиля QRDR области гена *gyrA* изолятов уреаплазм мутаций, ответственных за возникновение устойчивости к фторхинолонам нами не выявлено.

5.1.7.2 Молекулярно - генетическая характеристика гена *gyrB*

Выравнивание полных последовательностей гена *gyrB* изолятов *U.parvum* 445a и эталонного штамма (NC_002162.1) позволило определить следующее – ген *gyrB* *U.parvum* 445a высокогомологичен гену *gyrB* эталонного штамма - выявлено три нуклеотидные замены, не затрагивающие кодоны аминокислот; Отмечено, что в консервативной QRDR области гена *gyrB* исследуемых изолятов *U.parvum* обнаружено 11 ранее не описанных

аминокислотных замен, роль которых в формировании устойчивости к фторхинолонам пока неизвестна.

Сопоставление последовательностей генов *gyrB* изолятов *U.urealyticum* (УУ445, УУ1000, УУ1000а, УУ1051) с геном *gyrB* эталонного штамма (NC_011374.1) позволило установить высокую гомологию последовательностей гена *gyrB* *U.urealyticum* 1000, *U.urealyticum* 1000а и *U.urealyticum* 1051. В последовательности *gyrB* *U.urealyticum* 1000 выявлена лишь одна нуклеотидная замена, не ведущая к изменению аминокислотного состава гена. В гене *gyrB* изолята *U.urealyticum* 1051 выявлены 3 нуклеотидные замены, одна из которых детерминировала замену лизина (L) на метионин (M) в 576 положении. Иная картина наблюдается при оценке мутационного профиля гена *gyrB* штамма *U.urealyticum* 445, в структуре данного гена зарегистрированы многочисленные нуклеотидные (180) и аминокислотные (25) замены. Однако, замен в гене *gyrB* *U.urealyticum* 445, играющих ключевую роль в возникновении фторхинолон-резистентности, нами не обнаружено.

5.1.7.3 Молекулярно - генетическая характеристика гена *parC*

Последовательности генов *parC* штаммов *U.urealyticum* (УУ445, УУ1000, УУ1000а, УУ1051) отличались множественными мутационными изменениями как в нуклеотидной (более 200), так и в аминокислотной последовательности (более 50). При выравнивании последовательностей гена *parC* изолятов *U.parvum* 1051а и эталонного штамма (NC_002162.1) установлен высокий уровень их гомологии, выявлено 5 точечных замен, не затрагивающих кодоны аминокислот.

Биоинформационный анализ полной последовательности гена *parC* клинического изолята *U.parvum* 445а позволил определить 12 точечных замен в его нуклеотидной последовательности, которые привели к девяти аминокислотным заменам. Семь из них встречались в менее консервативной области гена между 272 и 427 аминокислотной позицией. Следует отметить,

что в QRDR области *parC* изолята *U.parvum* 445a выявлена аминокислотная замена серина (S) на лейцин (L) в 83 позиции, обусловленная нуклеотидной мутацией C248T (Рисунок 34).

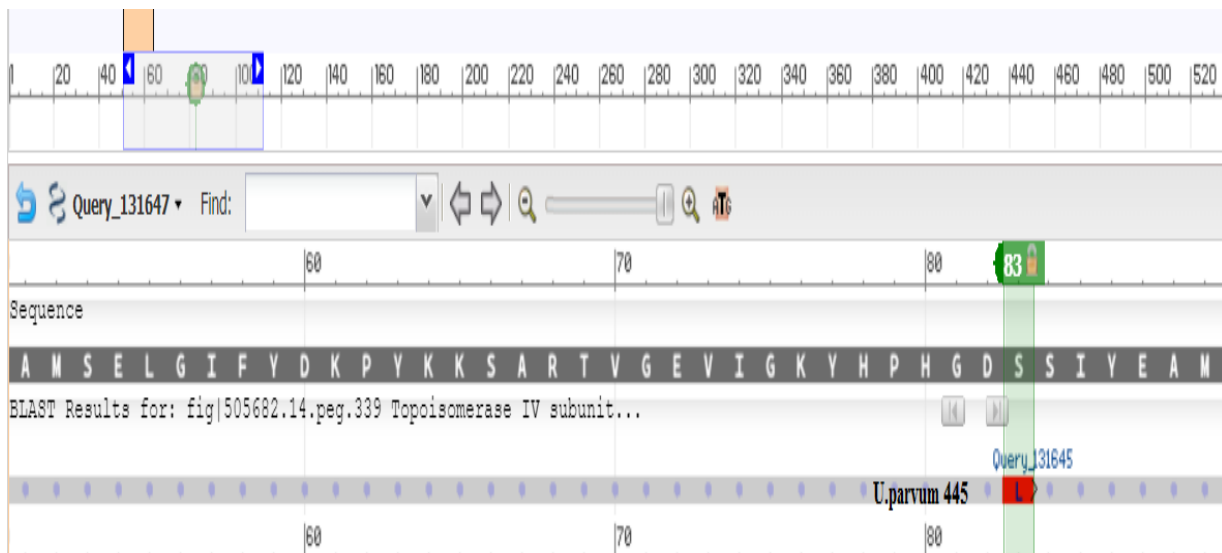


Рисунок 34 - QRDR область гена *parC* клинического изолята *U. parvum* 445a. Выделена аминокислотная замена серина (S) на лейцин (L) в 83 позиции.

Известно, что данная мутация приводит к нарушению связывания фторхинолонов с топоизомеразой IV, и тем самым, к формированию устойчивости к препаратам этой группы.

5.1.7.4 Молекулярно - генетическая характеристика гена *parE*

Результаты выравнивания последовательностей гена *parE* исследуемых изолятов *U.urealyticum* (УУ445, УУ1000, УУ1000а, УУ1051) и *U.parvum* (УП445а, УП1051а) относительно эталонных штаммов (NC_011374.1, NC_002162.1) с использованием сервера BLAST свидетельствуют о высоком уровне генетического полиморфизма исследуемых генов у изолятов *U.urealyticum* 1000 и *U.urealyticum* 1000а и эталонных штаммов. Так, в гене *parE* *U.urealyticum* 1000 определена 201 точечная нуклеотидная замена, в гене *parE* *U.parvum* 1000а обнаружено 199 нуклеотидных замен и 30

аминокислотных. В аминокислотной последовательности гена *parE* изолята *U. urealyticum* 445 обнаружено всего несколько аминокислотных замен.

Анализ аминокислотной последовательности гена *parE* *U. urealyticum* 1000a позволил выявить две мутации, ответственные за возникновение фторхинолон-резистентности, а именно – замена аспарагина (N) на аспарагиновую кислоту (D) в 151 позиции (рисунок 35) и замена валина (V) на треонин (T) в 417 позиции (Рисунок 36).

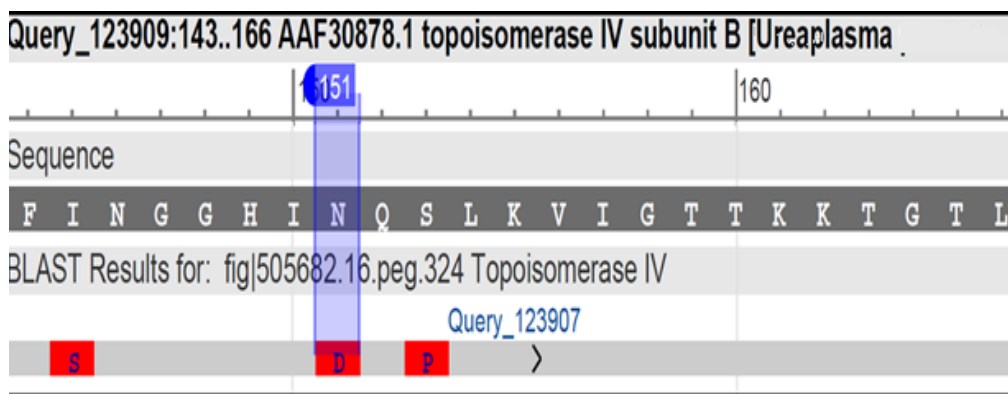


Рисунок 36 - Участок гена *parE* клинического изолята *U. urealyticum* 1000a, выделена мутация в 151 положении.

Следует отметить, что рядом с мутацией в 151 позиции выявлены две дополнительные, ранее не описанные, аминокислотные замены в 144 и 153 положениях, вероятно участвующие в процессе приобретения фторхинолон-резистентности данного изолята.

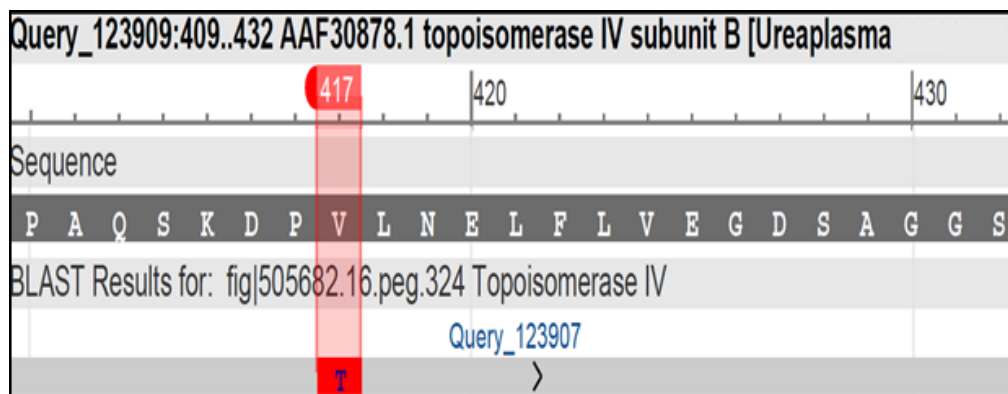


Рисунок 37 - Участок гена *parE* клинического изолята *U. urealyticum* 1000a, выделена мутация в 417 положении.

Таким образом, молекулярный механизм фторхинолон-резистентности у двух исследуемых изолятов (*U.parvum* 445a и *U.urealyticum* 1000a) обусловлен выявленными нами мутационными изменениями в гене *parC* изолята *U.parvum* 445a в 84 позиции (замена лейцина (L) на серин (S)) и в гене *parE* изолята *U.urealyticum* 1000a в 151 положении (аспарагина (N) на аспарагиновую кислоту (D)) и 417 позиции, (замена валина(V) на триптофан (T)). Устойчивость изолятов *U.urealyticum* (УУ445, УУ1000, УУ1051) и *U.parvum* 1051a вероятнее всего, связана с альтернативным механизмом – активным выведением антибиотика из клетки посредством ABC транспортеров.

5.1.8 Молекулярно-генетическая характеристика ABC системы мембранного транспорта изолятов *Ureaplasma spp.*

Аннотирование и изучение геномных последовательностей с использованием сервера RAST клинических изолятов *U.urealyticum* (УУ445, УУ1000, УУ1000a, УУ1051) и *U.parvum* (УП445a, УП1051a) позволил выявить гены эффлюксной системы ABC - транспортеров (ATP-binding cassette superfamily) исследуемых уреаплазм.

Структурная организация системы ABC изолятов *U.parvum* состоит из белков, транспортирующих олиго- и дипептиды. Олиготранспортеры представлены 2 оперонами *OppV* (транспортные белки пермеазы), белком *OorA* и *OorC*. Первый оперон *OppV*, входит в состав белкового суперсемейства AAA, его размер составил 383 аминокислоты. Второй оперон *OppV* - 377 аминокислот, относится к подсемействам *DppC* и *SapB*, содержит в своем составе пермеазный компонент антимикробной защиты типа ABC. *OorA* состоит из 226 аминокислот, *OorC* - 332 аминокислоты, оба выполняют функции АТФазы в различных бактериальных процессах. Дипептиды были представлены одним белком – *DppF* (439 аминокислот), который отвечает за транслокацию различных соединений через биологические мембраны.

Сравнительный анализ показал, что система ABC транспортеров *U.urealyticum* имела аналогичное строение, что и система ABC у *U.parvum*. Основные отличия выявлены в размерах транспортных белков системы ABC, в частности первый оперон OppB – 521 аминокислота, второй – 381, OopA – 1130. Последовательности OopC и DppF имели такие же размеры, как аналоги у *U.parvum*.

Выравнивание последовательностей генов, кодирующих белки системы ABC транспортеров исследуемых изолятов уреаплазм и генов других представителей видов *U.parvum* и *U.urealyticum*, депонированными в международной системе GenBank, показало их высокую идентичность (от 70% до 100%), гомология с представителями рода *Mycoplasma* была высокой и варьировала от 40% до 68%.

Результаты полногеномного секвенирования не выявили у уреаплазм генов, кодирующих белки семейства эффлюксной системы MATE.

5.1.9 Характеристика молекулярных механизмов резистентности клинических изолятов *Ureaplasma ssp.* к макролидам

5.1.9.1 Генетическая характеристика 23S рРНК

Анализ нуклеотидных последовательностей 23S рРНК клинических изолятов уреаплазм с использованием сервера RAST позволил выявить, что субъединица гена 23S рРНК, как и у *M.hominis*, представлена двумя копиями. Размер нуклеотидной последовательности 23S рРНК исследуемых штаммов *U.urealyticum*, *U.parvum* составил 2903 п.о.

Сравнительная оценка полной нуклеотидной последовательности 23S рРНК исследуемых изолятов *U.parvum* относительно репрезентативного штамма (NC_002162.1) позволила установить значительные отличия в структуре гена 23S рРНК, заключающиеся в большом количестве точечных замен. Число нуклеотидных замен варьировало от 12 у *U.parvum* 445a до 48 у изолята *U.parvum* 1051a. Следует отметить, что большинство из выявленных

мутаций располагались в области V домена 23S рРНК с 2450 по 2630 нуклеотиды.

Изучение структуры гена 23S рРНК изолятов *U.urealyticum*, позволило установить высокий уровень гомологии *U.urealyticum* 1051 и 23S рРНК референс - штамма (NC_011374.1), всего выявлено 4 нуклеотидные замены.

В последовательности 23S рРНК *U.urealyticum* 445, *U.urealyticum* 1000 и *U.urealyticum* 1000a при сравнении с эталонным штаммом выявлено от 38 и 42 точечных замен соответственно. Определено, что большинство замен располагалось в районе с 2230 по 2600 нуклеотид.

Классических замен в позициях с 2057 по 2062 (по *E.coli*) в 23S рРНК исследуемых клинических изолятов *U.urealyticum* и *U.parvum* не обнаружено.

5.1.9.2 Молекулярно-генетическая характеристика рибосомных белков L4 и L22

Анализ нуклеотидных и аминокислотных последовательностей генов, кодирующих белки L4 и L22 *U.urealyticum* и *U.parvum* позволил определить, что размер белка L4 является видоспецифичным. Размер нуклеотидной последовательности гена, кодирующего рибосомный белок L4 изолятов *U.parvum*, составил 636 нуклеотидов, аминокислотной - 121 аминокислота, *U.urealyticum* – 479 нуклеотидов и 211 аминокислот.

Размер гена, кодирующего белок L22, как у *U.parvum*, так и *U.urealyticum* не отличался и составил 933 нуклеотида и 311 аминокислот.

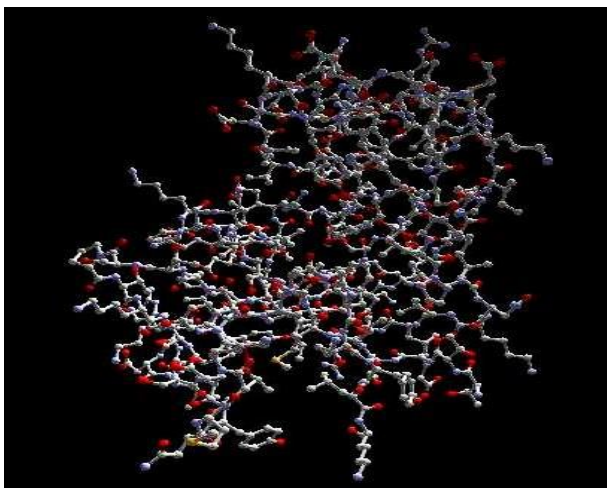


Рисунок 38 - Модель третичной структуры белка L22 *U.urealyticum* 1000a

Примечание: Получено с помощью сервера Phyre2 web portal for protein modeling и программного обеспечения UGENE Unipro 1.31

Мутационных изменений в последовательности гена, кодирующего белок L4 клинических изолятов *U.urealyticum* 1000, *U.urealyticum* 1051 относительно эталонного штамма (NC_002162.1) не выявлено.

Замены в нуклеотидной последовательности, приводящие к изменению аминокислотной последовательности белка L4, обнаружены у клинических изолятов *U.urealyticum* 445, *U.urealyticum* 1000a и у всех включенных в исследование *U.parvum* (УП445, УП1051).

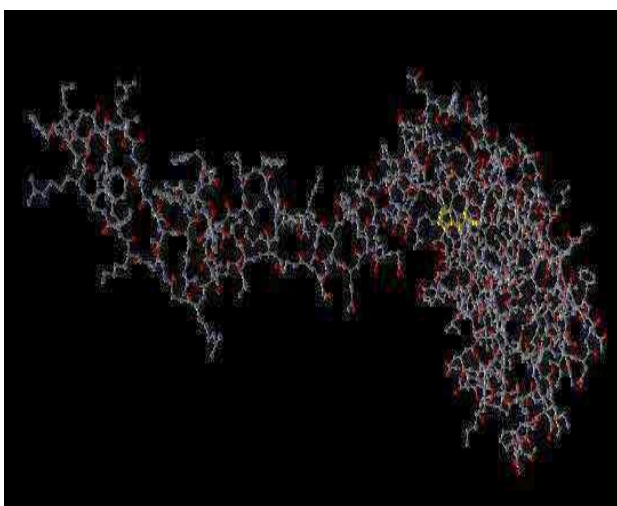


Рисунок 39 - Модель третичной структуры белка L4 *U.urealyticum* 445

Примечание: Получено с помощью сервера Phyre2 web portal for protein modeling и программного обеспечения UGENE Unipro 1.31

Аминокислотные замены выявлены в одной позиции у *U.urealyticum* 445, в трех - *U.parvum* 445a, *U.urealyticum* 1000, *U.urealyticum* 1000a и *U.urealyticum* 1051. У всех трех штаммов выявлена мутация в 162 положении (замена аспарагина (N) на гистидин (H)) (Таблица 20).

Таблица 20 - Молекулярно-генетическая характеристика гена, кодирующего белок L4 клинических изолятов *Ureaplasma ssp.*

Изолят	Мутации в последовательности L4	
	Нуклеотидные замены	Аминокислотные замены
<i>U. urealyticum</i> 445	A484C	162 аспарагин(N) - гистидин(H)
<i>U. parvum</i> 445a	A241G	81 аланин (A) – треонин (T)
	C480A	160 валин (V) – аланин (A)
	A484C	162 аспарагин(N) - гистидин(H)
<i>U. urealyticum</i> 1000a	G242C	81 аланин (A) – глицин (G)
	C480A	160 валин (V) – аланин (A)
	A484C	162 аспарагин(N) - гистидин(H)
<i>U.urealyticum</i> 1051	G242C	81 аланин (A) – глицин (G)
	C480A	160 валин (V) – аланин (A)
	A484C	162 аспарагин(N) - гистидин(H)

Изменений в составе полной последовательности гена, кодирующего рибосомный белок L22 у изолятов *U.urealyticum* 1000, *U.urealyticum* 1051 и *U.parvum* 445, не обнаружено. В гене, кодирующем L22 изолята *U.urealyticum* 445, выявлено три нуклеотидных замены, одна из которых привела к изменению аминокислотной последовательности в позиции 219 V (валин) →I (изолейцин). Сравнительный анализ последовательности гена, кодирующего белок L22 у *U.urealyticum* 1000a и *U. parvum* 1051a относительно референс-штамма (NC_002162.1) позволил определить у изучаемых изолятов шесть аминокислотных замен (Таблица 21).

Таблица 21 - Мутационные изменения последовательности гена, кодирующего белок L22 *U.urealyticum* 445 и 1000a, *U.parvum* 1051a относительно референс-штаммов (NC_002162.1, NC_011374.1).

Изолят	Мутации в последовательности L22	
	Нуклеотидные замены	Аминокислотные замены
<i>U. urealyticum</i> 445	G654A	219 валин (V) → изолейцин (I)
<i>U. urealyticum</i> 1000a	C394U	132 аланин (A) – валин (V)
<i>U. parvum</i> 1051a	A406G	136 изолейцин (I) - валин (V)
	C454U	152 изолейцин (I) - треонин (T)
	G556A	186 лизин (K) – глут.кис-та (E)
	A655G	219 изолейцин (I) - валин (V)
	G773A	258 серин (S) - аспарагин(N)

Таким образом, резистентность клинических изолятов *U.urealyticum* (УУ445, УУ1000, УУ1000а, УУ1051) и *U.parvum* (УП445, УП1051) к макролидам обусловлена мутационными модификациями в рибосомных белках L4 и L22.

5.2 Расширенное мультилокусное типирование штаммов *Mycoplasma hominis*

Впервые схема молекулярного типирования изолятов *Mycoplasma hominis* была предложена в 2018 г. группой тунисских ученых и легла в основу базы данных, содержащих информацию о генетическом разнообразии *Mycoplasma hominis* [120]. Учитывая генетический полиморфизм микоплазм, в 2018 году тунисскими исследователями Boujema S. et al. была предложена расширенная (eMLST) схема молекулярного типирования, включающая не только анализ относительно консервативных последовательностей генов «домашнего хозяйства» (*gyrB*, *tuf*, *ftsY*, *uvrA*, *gap*), но и анализ генов вирулентности (*p120'*, *vaa*, *lmp1*, *lmp3*, *p60*), для определения сиквенс- (ST-

тип) и патотипа (VT-тип) клинических изолятов *Mycoplasma hominis*, выделенных у пациентов с воспалительными заболеваниями органов малого таза и бесплодием [120]. Наиболее исчерпывающую информацию о генетических абберациях *Mycoplasma hominis* позволяет получить технология NGS. По данным на 01 августа 2024г., в этой базе содержатся сведения о 66 геномах *Mycoplasma hominis*, выделенных на территории США и Туниса, и 234 аллельных вариантах, включенных в схему eMLST *Mycoplasma hominis*. В настоящее время в России отсутствует информация о генетической вариабельности урогенитальных микоплазм, ассоциированных с широким спектром воспалительных заболеваний мочевыводящих путей и органов репродукции.

Результаты, полученные при проведении мультлокусного секвенирования нижегородских изолятов *Mycoplasma hominis*, свидетельствуют о чрезвычайно высокой гетерогенности генов «домашнего хозяйства» и вирулентности, не только относительно вариантов, размещенных в базе PubMLST, но и внутри группы российских штаммов микоплазм, включенных в исследование.

Результаты типирования нижегородских штаммов *Mycoplasma hominis* M45, M57, MH529, MH621, MH1002, MH1019, MH1817, MH1861, MH1866, MH1991 позволили обнаружить 37 новых аллельных вариантов генов «домашнего хозяйства» и 41 аллель генов вирулентности, которые были депонированы в базу данных *Mycoplasma hominis* isolates database [120] (Приложение 3). Установлено, что геномы исследуемых изолятов содержат 78 новых, ранее не депонированных аллелей консервативных локусов и локусов, отвечающих за патогенность микоплазм. Несмотря на то что гены «домашнего хозяйства» являются высококонсервативными и менее подвержены генетическим изменениям в процессе эволюции, лишь в 13 случаях отмечено совпадение аллелей исследуемой группы штаммов микоплазм и штаммов, представленных в базе PubMLST. При анализе последовательностей «генов домашнего хозяйства» (MLST) у 5 изолятов

Mycoplasma hominis (MH1002, MH1019, MH1817, MH1861, MH1991) выявлен 10-й аллель локуса *gyrB* (Рисунок 40), у двух штаммов (М57, МН529) 7 аллель.

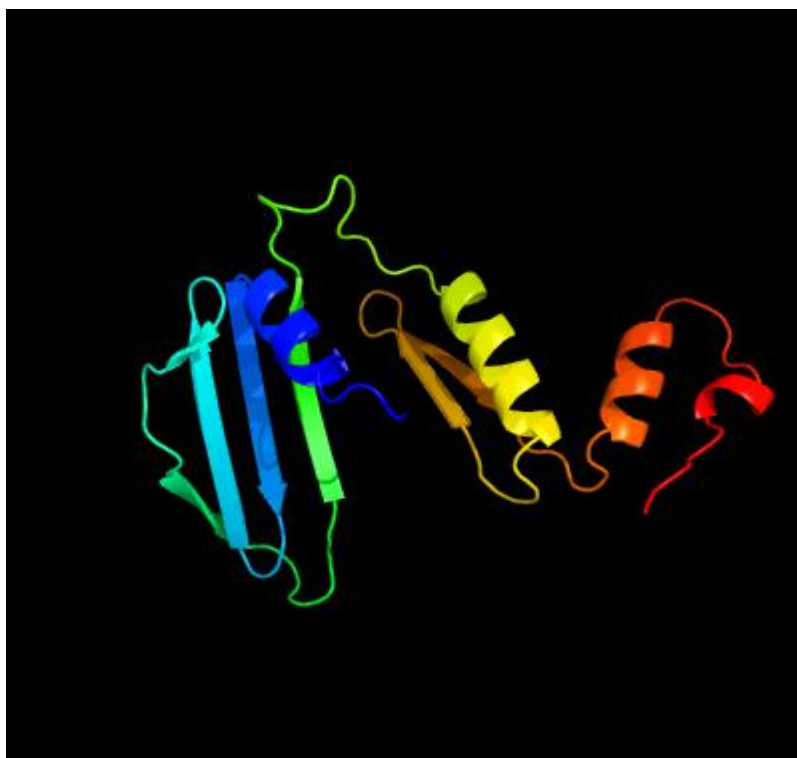


Рисунок 40 - Третичное изображение структуры белка GYRB клинического изолята *M.hominis* MH1991 (10 аллель)

Примечание: Цветное изображение N → C – терминальный конец

Размеры модели (Å): X:47.392 Y:59.078 Z:38.566

Изображение получено с использованием сервера Phyre2 web portal for protein modeling

Два локуса генов домашнего хозяйства (*gyrB* и *uvrA*) не имели одинаковых аллелей у исследуемых штаммов *Mycoplasma hominis* и представленных в базе PubMLST. В других двух локусах MLST (*gap* и *ftsY*) встречалось от 1 до 4 совпадений с аллельными вариантами тунисских штаммов, выделенных у женщин с бесплодием. Следует отметить, что ген *ftsY* играет ключевую роль в делении прокариотической клетки, четыре из десяти исследуемых изолятов имели полную идентичность аллелей этого локуса с уже размещенными геновариантами штаммов микоплазм. В двух случаях определено полное совпадение последовательности 1 аллеля локуса *ftsY* двух исследуемых изолятов (М57 и МН529) и эталонного штамма

Mycoplasma hominis (FP236530.1). Самым консервативным локусом у российских и тунисских изолятов *Mycoplasma hominis* оказался локус *tuf*, лишь два представителя исследуемой группы МН1002 и МН1866, характеризующиеся устойчивостью к фторхинолонам, имели уникальные, впервые описанные авторами аллели. Показано, что у трех российских изолятов (МН621, МН1019, МН1817) локус *tuf* совпадал с 7 аллелем тунисских штаммов микоплазм, относящихся к двум сиквенс-типам ST-10 и ST-62. Кроме того, при сравнительном анализе исследуемых и представленных в базе PubMLST штаммов, установлено, что 13 аллель гена *tuf* был идентичным у пяти изолятов *Mycoplasma hominis*, выявленных в России, Китае и Тунисе (Рисунок 41).

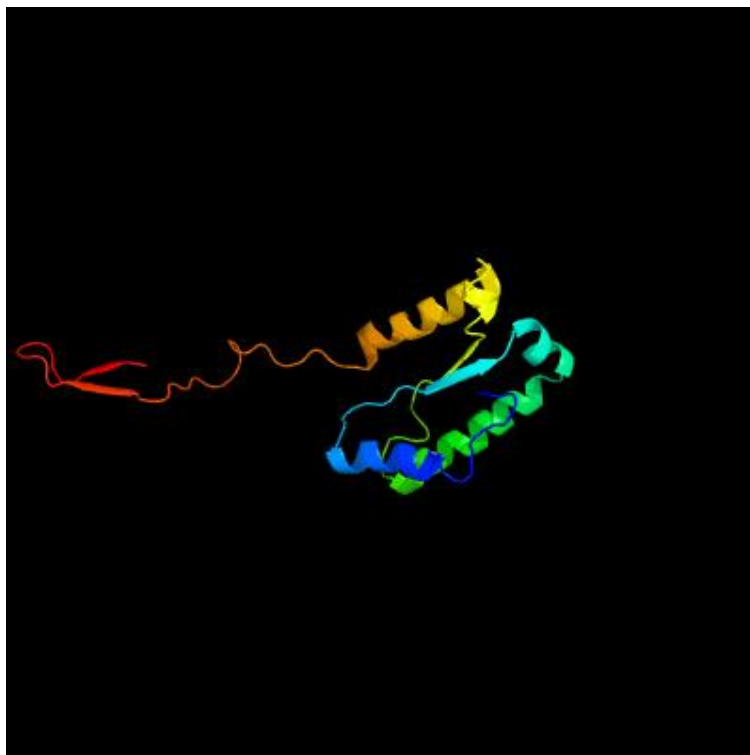


Рисунок 41 - Третьичное изображение структуры фактора элонгации TUF клинического изолята *M.hominis* МН1991 (13 аллель)

Примечание: Цветное изображение N → C – терминальный конец

Размеры модели (Å): X : 42,099 Y : 54,745 Z : 74,310

Изображение получено с использованием сервера Phyre2 web portal for protein modeling

Следует отметить, что российские и тунисские штаммы микоплазм были выделены из образцов эпителия цервикального канала женщин с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта и бесплодием, а китайский штамм MH-BL03 был обнаружен в крови пациентки с септическим состоянием после оперативного вмешательства на матке [217]. Китайский изолят *Mycoplasma hominis*, по данным Zeng T. et al., характеризовался устойчивостью к фторхинолонам и макролидам [218]. Штамм (ST51), выделенный в Тунисе, обладал устойчивостью к препаратам тетрациклинового ряда [120]. Российские штаммы отличались резистентностью к фторхинолонам (M57) и макролидам (MH1861, MH1991). На основании проведенного авторами MLST-типирования показано, что 7 геновариант локуса *tuf* был идентичным у трех изолятов микоплазм, включенных в исследование (MH621, MH1019, MH1817), и двух тунисских штаммов (ST-10, ST-62). По данным Boćjema S. et al., тунисские штаммы (2), выделенные из образцов эпителия вагины у женщин с бесплодием, характеризовались чувствительностью ко всем препаратам, применяемым при терапии воспалительных заболеваний урогенитального тракта. Особого внимания заслуживает генетическое сходство штаммов *Mycoplasma hominis*, выявленных у мужчин (MH621 и MH1817) и женщин (MH1019) репродуктивного возраста с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта и проблемами репродукции. Наибольшая гомология внутри исследуемой группы отмечена по 10-му аллелю локуса *gyrB* (у пяти изолятов) и по 14-му аллелю гена *gar* (у 4 изолятов). Кроме того, данные геноварианты встречаются только среди российских изолятов микоплазм. Высокие показатели генетической variability *Mycoplasma hominis* подтверждают существующую парадигму о геномной рекомбинации. Данные о сиквенс-типах и патотипах российских штаммов *Mycoplasma hominis*, представленные в таблице 2, получены впервые. Все изоляты *Mycoplasma hominis*, включенные в исследование, имеют уникальные, ранее не описанные ST- и VT-типы. Результаты типирования, основанного на анализе

генов вирулентности (MVLST), исследуемых штаммов микоплазм, показали чрезвычайное разнообразие их патотипов (таблица 23, приложение 4). Основными поверхностными адгезинами, ответственными за реализацию патогенного потенциала *Mycoplasma hominis*, принято считать гены *vaa* и *p120* [168]. Установлено полное совпадение последовательности 13 аллеля локуса *p120* ' *Mycoplasma hominis* M45 и четырех изолятов *Mycoplasma hominis* (MH56, MH57, MH58, MH59), выделенных в Тунисе у женщин с различными заболеваниями урогенитального тракта. Установлено, что последовательность гена *vaa*, кодирующего поверхностный адгезин, оказалась уникальной у каждого российского изолята, и лишь у двух штаммов (MH1861 и MH1866) данный локус был представлен 10 аллелем. Оба изолята были выделены у женщин с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта (Рисунок 42).

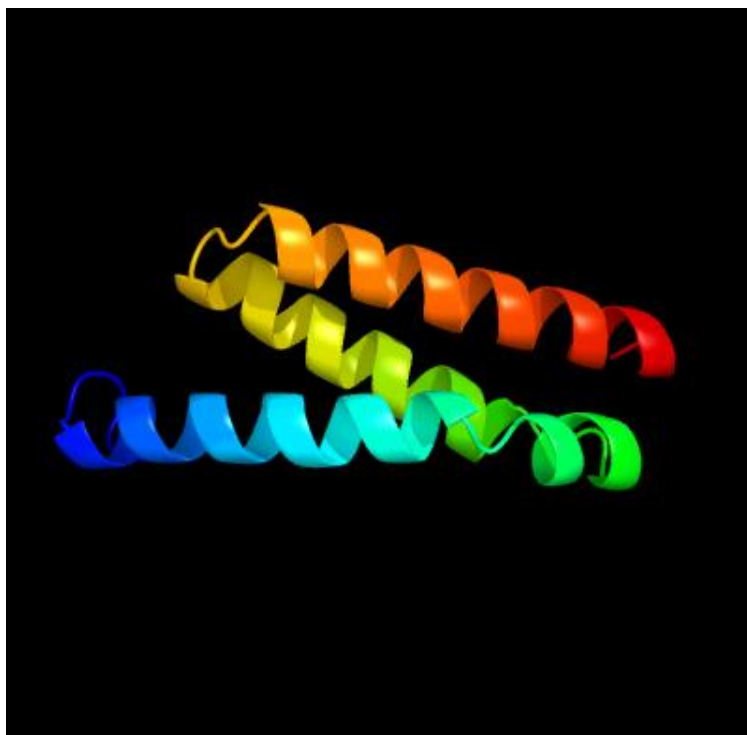


Рисунок 42 - Трети́чное изображение структуры белка VAA клинического изолята *M.hominis* MH1866

Примечание: Цветное изображение N → C – терминальный конец

Размеры модели (Å): X : 22,922 Y : 28,981 Z : 46,393

Изображение получено с использованием сервера Phyre2 web portal for protein modeling

Примечательно, что российские изоляты *Mycoplasma hominis* по отдельным локусам патогенности имели сходство с китайскими изолятами микоплазм. Такая вариабельность комбинаций аллельных вариантов, установленная с помощью расширенного молекулярного типирования изолятов *Mycoplasma hominis*, свидетельствует о различной степени их генетического полиморфизма в различных популяциях урогенитальных микоплазм, циркулирующих в странах мира. Определено полное совпадение 2 аллеля гена *р60* у российских штаммов *Mycoplasma hominis* (МН1861 и МН1866) и 19 изолятов микоплазм, выделенных у пациенток из Туниса. В одном случае обнаружена гомология 21 аллеля локуса *Imp1* у российского изолята МН621, выделенного из образца эпителия уретры мужчины, страдающего бесплодием, и китайского штамма *Mycoplasma hominis*. В настоящее время как в Российской Федерации, так и за рубежом имеется существенный недостаток информации о структуре генома циркулирующих штаммов *Mycoplasma hominis*, а также об их факторах патогенности, что связано с трудностями индикации и идентификации данного возбудителя с использованием классических микробиологических методов исследования. Результаты расширенного молекулярного типирования *Mycoplasma hominis* с помощью технологии высокопроизводительного секвенирования (NGS), впервые проведенного в России, позволили получить новые знания о генетическом разнообразии и факторах патогенности *Mycoplasma hominis*, ассоциированных с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта и нарушением репродуктивной функции у женщин и мужчин, что имеет научно-практическое значение для фундаментальной и прикладной микробиологии. Информация, представленная в международной базе данных PubMLST, содержит лишь сведения о геноме единичных штаммов микоплазм, циркулирующих в Тунисе и Китае. Регистрация новых локусов *Mycoplasma hominis* позволила существенно расширить представленность аллельных вариантов российских изолятов, что необходимо для проведения полноценного филогенетического анализа на качественно новом уровне, а

также для поиска источников и факторов передачи при нозокомиальных инфекциях.

5.3 Филогенетический анализ полных последовательностей генома клинических изолятов *M.hominis*, *U.urealyticum* и *U.parvum*

Одним из новых перспективных направлений в молекулярной биологии является филогенетический анализ микроорганизмов, позволяющий получать сведения об их эволюционных взаимоотношениях с помощью сравнения как отдельных генов (мутантный и дикий тип), так и всего генома бактерий [20, 76].

Результаты филогенетического анализа дают возможность проводить реконструкцию генома урогенитальных микоплазм, изучать эволюцию и оценивать наличие генов, ответственных за резистентность и патогенность, в том числе новых генетических маркеров.

С целью определения эволюционного разнообразия антибиотикорезистентных клинических изолятов *M. omnis*, *U.urealyticum* и *U. arvum*, циркулирующих на территории Нижегородского региона, проведен филогенетический анализ полных нуклеотидных последовательностей их генома.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей полных геномов исследуемых штаммов проводили с использованием web-сервиса REALPHY Online tool версия 1.12 (<https://realphy.unibas.ch/fcgi/realphy>). В анализ включены все полные нуклеотидные последовательности геномов *Mycoplasma hominis*, *Ureaplasma urealyticum* и *Ureaplasma parvum*, депонированных в базе данных RefSeq NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/refseq>).

В представленной работе построение филогенетических деревьев осуществляли методом Neighbour joining [189] с использованием программного обеспечения MEGA7 [177].

5.3.1 Филогенетический анализ генома *M. hominis*

В настоящее время, как в Российской Федерации, так и за рубежом имеется существенный недостаток информации о полных последовательностях генома штаммов *Mycoplasma hominis*. На данный момент в международной базе GenBank/NCBI задепонированы полные последовательности генома 72 штаммов *M. hominis*, 10 из которых получены в ходе проведенного нами исследования. Построение филогенетического дерева основано на результатах анализа единичных нуклеотидных полиморфизмов (SNP) полных геномов изолятов *Mycoplasma hominis* МН45, МН57, МН529, МН621, МН1002, МН1019, МН1817, МН1861, МН1866, МН1991, а также 62 штаммов *M. hominis* из разных географических регионов, представленных в базе данных GenBank/NCBI (Рисунок 43).

Филогенетический анализ полных нуклеотидных последовательностей генома изолятов *Mycoplasma hominis*, депонированных в GenBank/NCBI показал, что геномы российских изолятов микоплазм входят в состав 3 крупных клад (I, II, III) с уровнем значения бутстрап для узлов от 26 до 100. Клада I включает в себя четыре нижегородских штамма (М45, МН1991, МН1019, МН1002) с уровнем значения бутстреп от 26 до 65, что не позволяет судить о высоком уровне их идентичности. Достоверными считаются значения бутстрап для узлов ≥ 70 . Следует отметить, что нижегородские изоляты *Mycoplasma hominis*, входящие в состав I клады, изолированы от основных групп, исследуемых микоплазм. Клада II включает в себя две большие монофилетические группы, в которые собраны последовательности геномов изолятов *Mycoplasma hominis*, циркулирующие на территории России, Германии, США и Франции с уровнем поддержки бутстреп от 59 до 100. Несмотря на то, что в составе клады II преобладали последовательности российских изолятов *Mycoplasma hominis*, 7 геномов из 17-ти были зарубежными, что свидетельствует об эволюционной вариабельности штаммов, циркулирующих как в России, так и за рубежом.

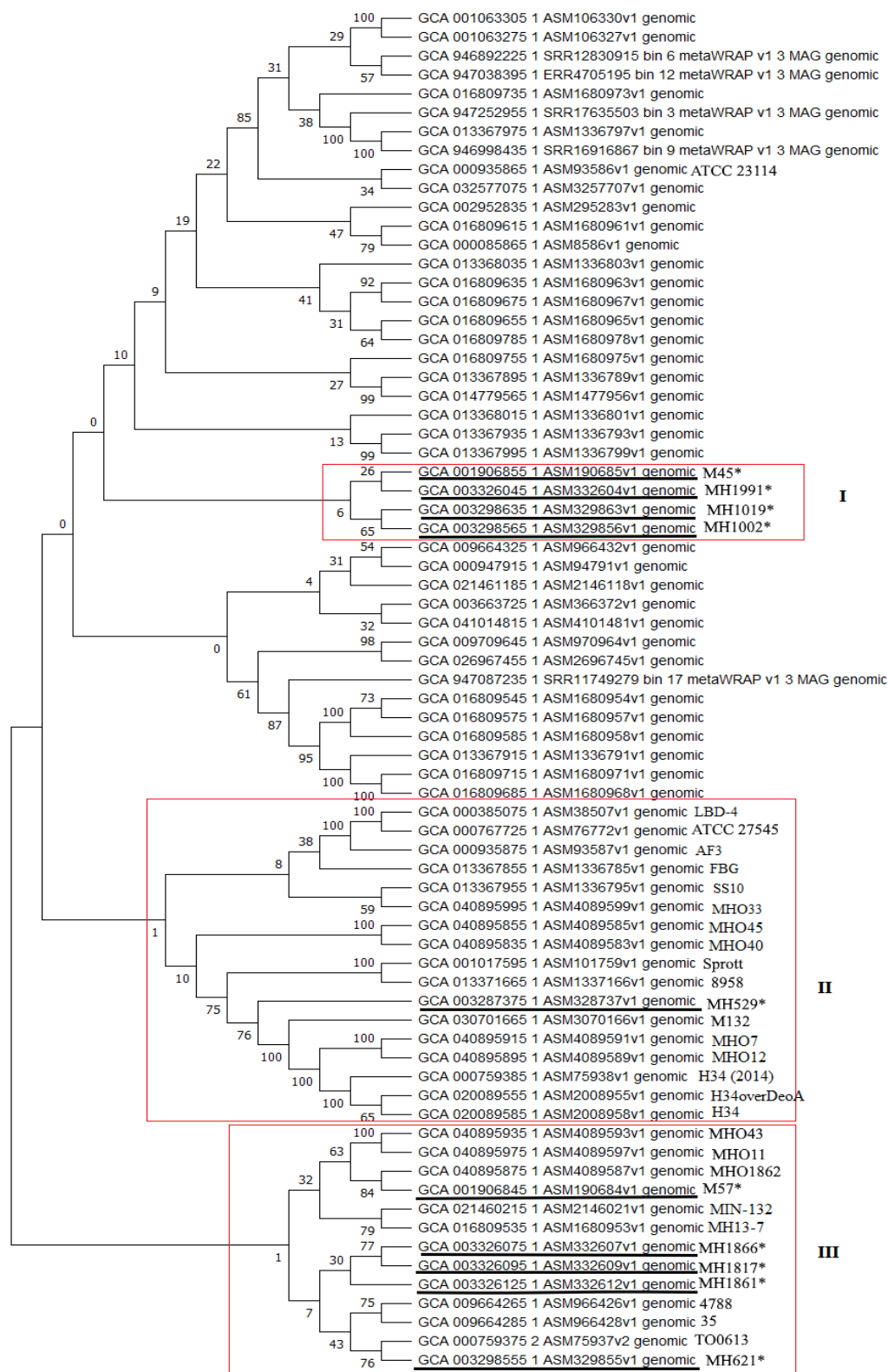


Рисунок 43. Филогенетическое дерево нуклеотидных последовательностей геномов исследуемых штаммов *M. hominis* и депонированных в базе данных GenBank/NCBI, построенная с использованием метода Neighbour joining. Примечание: цифры в узлах дерева обозначают уровень поддержки, полученный с помощью метода rapid bootstrap

Клинический изолят МН521 занимает обособленное положение и наиболее отдален от штаммов микоплазм, выделенных в Нижегородском регионе. Базальнее ветви, которую занимает изолят МН521, дивергировал кластер, включающий высокгомологичные (уровень бутстреп - 100) последовательности геномов Американского (М132) и Немецкого (8958) штаммов микоплазм.

Клада III состоит из двух крупных монофилетических групп, включающие геномы изолятов *Mycoplasma hominis*, выделенные на территории Америки, Великобритании, Франции и России. У нижегородского изолята *M. hominis* М57 выявлен высокий уровень гомологии (уровень бутстреп - 84) нуклеотидных последовательностей с российским фторхинолон-резистентным штаммом МО18862, выделенным у женщины с урогенитальной инфекцией (штамм для секвенирования предоставлен Тараскиной А.Н. НИИ акушерства, гинекологии и репродуктологии им. Н.Э. Баумана, Санкт-Петербург). На сестринской линии, располагается ранее филогенетически отсоединившийся кластер, включающий близкородственные геномы микоплазм, циркулирующих на территории Великобритании (MIN-132) и США (МН13-7) (уровень бутстреп - 79). Четыре нижегородских изолята *Mycoplasma hominis* (МН1866, МН1817, МН1861, МН621) входят во вторую монофилетическую группу III клады, уровень бутстреп варьировал от 75 до 77. Установлено близкое родство последовательностей генома нижегородских изолятов *M. hominis* 1817 и *M. hominis* 1866 (уровень бутстреп - 77), формирующих единый кластер, от которого ранее в отдельную ветвь дивергировал изолят *M. hominis* МН1861. Другой нижегородский изолят *Mycoplasma hominis* МН621 образуя единый кластер филогенетически родственен российскому штамму *M. hominis* Т00613, выделенному у женщины с сальпингитом. Примечательно, что геномы всех исследуемых изолятов микоплазм филогенетически

располагаются далеко относительно референсных штаммов микоплазм *M.hominis* ATCC 27545 и *M.hominis* ATCC 23114.

5.3.2 Филогенетический анализ генома *U.parvum*

Сложность проведения филогенетического анализа генома штаммов *U.parvum* определяется отсутствием масштабных сведений о полной последовательности их геномов. На сегодняшний день в международную базу данных GenBank/NCBI депонированы лишь 29 геномов *U.parvum*.

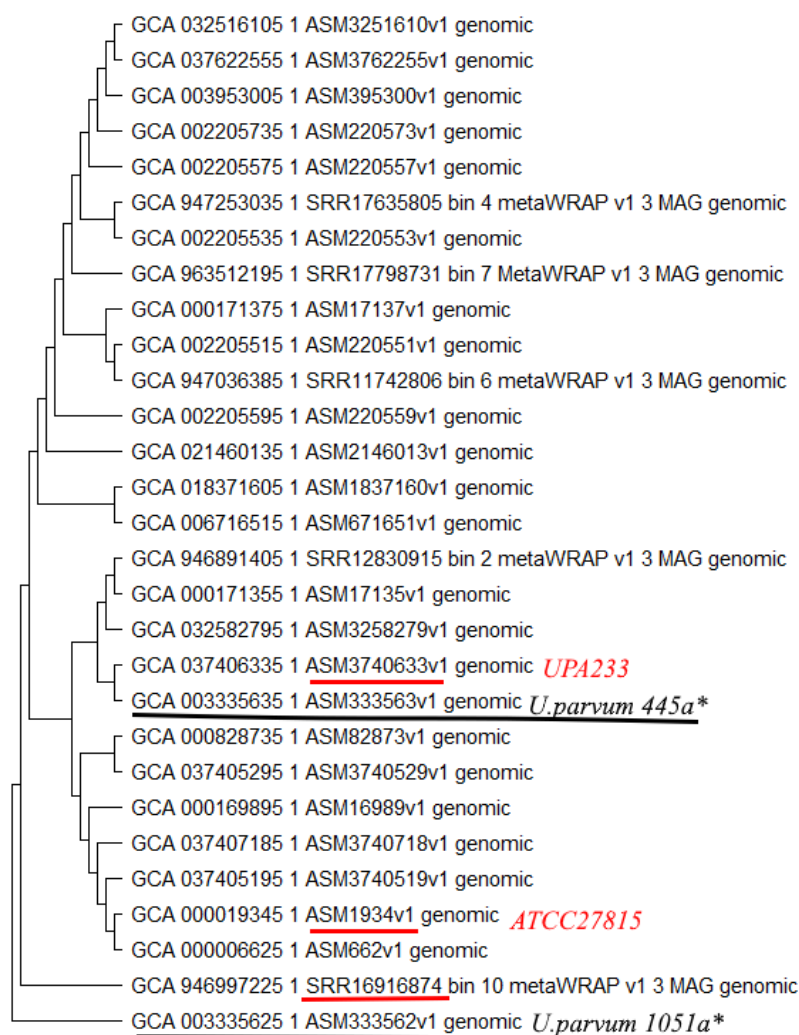


Рисунок 44 - Дендрограмма нуклеотидных последовательностей геномов исследуемых и депонированных в базе данных GenBank/NCBI штаммов *Ureaplasma parvum*, построенная с использованием метода Neighbour joining.

Филогенетический анализ нуклеотидных последовательностей геномов исследуемых штаммов *U.parvum* позволил установить, что исследуемые изоляты занимают обособленное положение относительно друг друга. Показано, что клинический изолят *U.parvum* 445а эволюционно ближе всего расположен и формирует единый кластер с китайским штаммом *U.parvum* UPA233, депонированным в GenBank/NCBI. Следует отметить, что изолят *U.parvum* 1051а дивергировал от основной группы уреаплазм, чьи геномы депонированы GenBank/NCBI и выделен в отдельную филогенетическую ветвь. Эволюционно ближе изолят *U.parvum* 1051а располагается к американскому штамму *U.parvum* SRR16916874_bin.10_metaWRAP_v1.3_MAG.

5.3.3 Филогенетический анализ генома *U.urealyticum*

Анализ филогении 28 штаммов *Ureaplasma urealyticum*, геномы которых депонированы в международную базу данных GenBank/NCBI, свидетельствует о том, что два изолята *U.urealyticum* 445 и *U.urealyticum* 1051 наиболее отдалены от остальных представителей вида *U.urealyticum* (Рисунок 45).

Дендрограмма показала, что геномы штаммов *U.urealyticum* 445 и *U.urealyticum* 1051 являются наиболее удаленными от других геномов, депонированных в базе данных GenBank/NCBI, каждый из них занимает отдельную филогенетическую ветвь. Изолят *U.urealyticum* 1000 и *U.urealyticum* 1000а высокогомологичны и располагаются в одном кластере с референс - штаммом *U.urealyticum* serovar 10 str.ATCC 33699 (NC_011374.1), выделенным в США (Shrivastava S. с соавт., в 2008г.).

Оба штамма относятся к филогенетической ветви, в состав которой также входят американские штаммы *U.urealyticum* serovar 13 str. ATCC 33698 (штамм выделен в штате Мэриленд, США - Methe B.A. с соавт., 2007г.) и *U.*

urealyticum serovar 2 str. ATCC 27814 (штамм выделен в штате Мэриленд, США - Methe B.A. с соавт., 2009г.)

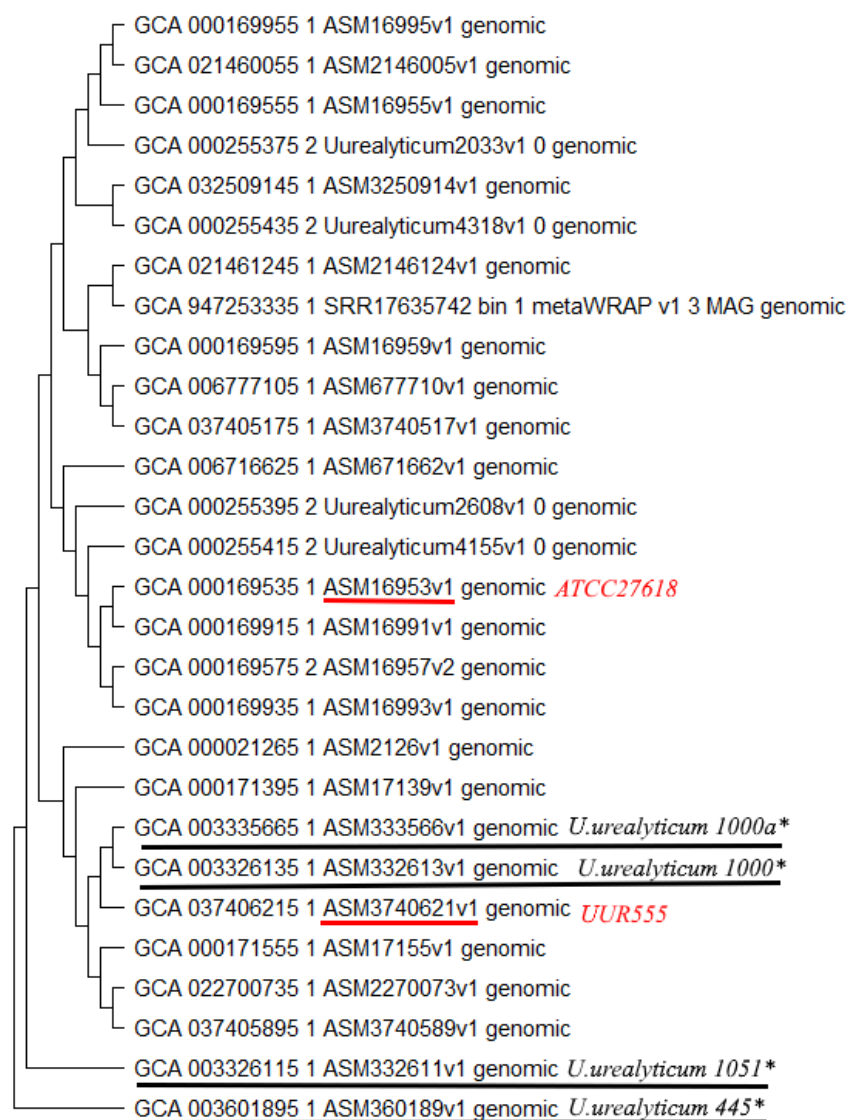


Рисунок 45 - Дендрограмма нуклеотидных последовательностей геномов исследуемых штаммов *Ureaplasma urealyticum* и депонированных в базе данных GenBank/NCBI, построенная с использованием метода Neighbour joining.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Возрастающая антибиотикорезистентность микроорганизмов, в том числе урогенитальных микоплазм, остаётся одной из приоритетных проблем современного здравоохранения. Бактерии родов *Mycoplasma* и *Ureaplasma* характеризуются высоким уровнем генетического полиморфизма, играющего ведущую роль в процессах формирования резистентности к антибактериальным препаратам. В последние годы, данные отечественной и зарубежной литературы свидетельствуют об увеличении частоты выявления урогенитальных микоплазм, резистентных к препаратам фторхинолонового ряда и макролидам, наиболее часто применяемым при лечении воспалительных заболеваний органов малого таза.

Впервые в условиях промышленного мегаполиса проведено крупномасштабное динамическое исследование распространенности и резистентности к антибиотикам клинических изолятов микоплазм и уреаплазм, ассоциированных с широким спектром заболеваний органов урогенитального тракта. Установлены основные молекулярные механизмы устойчивости изолятов *M. genitalium*, *M. hominis*, *U. parvum* и *U. urealyticum* к макролидам, фторхинолонам, тетрациклинам, наиболее часто применяемым при лечении урогенитальных инфекций. На основании биоинформационного анализа последовательностей генома клинических изолятов *M. hominis*, *U. parvum* и *U. urealyticum* выявлены не только известные, но и ранее не описанные мутационные изменения в генах, кодирующих топоизомеразы (ДНК-гираза и топоизомераза IV) и рибосомные белки (L4 и L22). С использованием NGS секвенирования, впервые у российских штаммов *M. hominis* описаны и охарактеризованы гены, кодирующие белки эффлюксной системы MATE, ответственные за формирование множественной лекарственной устойчивости. Результаты расширенного молекулярного типирования *Mycoplasma hominis* с помощью технологии высокопроизводительного секвенирования (NGS), впервые проведенного в России, позволили получить новые знания о популяционной структуре и

патогенных свойствах урогенитальных микоплазм, имеющих важное значение в аспекте понимания эволюции бактерий и патогенеза заболеваний, ассоциированных с *Mycoplasma hominis*. Регистрация 78 новых локусов генома российских изолятов *Mycoplasma hominis* в международной базе данных PubMLST позволила существенно расширить представленность их аллельных вариантов, что будет способствовать проведению филогенетического анализа на качественно новом уровне. Информация, полученная при молекулярном типировании штаммов, необходима для оценки эволюционного разнообразия *Mycoplasma hominis* и понимания процесса реализации их патогенных свойств. Мутационные изменения, выявленные в генах «домашнего хозяйства» и генах, кодирующих поверхностные белки (VAA, P60, P120), могут служить дополнительными эпидемиологическими маркерами штаммов *Mycoplasma hominis*.

Таким образом, представленные в монографии результаты многолетних исследований, имея прямое отношение к реализации «Стратегии предупреждения распространения антимикробной резистентности на период до 2030 года», утвержденной распоряжением Правительства Российской Федерации, позволили решить её основные задачи, а именно: оценить структуру популяции урогенитальных микоплазм, циркулирующих среди репродуктивного населения Нижегородского региона, установить распространенность полирезистентных штаммов и определить основные механизмы их антибиотикорезистентности.

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ ЛИТЕРАТУРЫ

1. Акимова В.В., Погосян Г.П., Коновалова А.А., Карибаева М.И. Анализ видов уреаплазм различными методами детекции продуктов полимеразной цепной реакции // Биотехнология. Теория и практика. – 2012. - № 4. – С. 10 – 14.
2. Алексеева А.Е., Бруснигина Н.Ф. Возможности и перспективы применения методов массивного параллельного секвенирования в диагностике и эпидемиологическом надзоре за инфекционными заболеваниями // Электронный журнал «МедиАль». – 2014. – Т. 12. № 2. – С. 6 – 28.
3. Андреева И.В., Козлов С.Н., Королев С.В., Беликов А.Н., Гринев А.В., Евстафьев В.В. Тактика ведения пациентов с негонококковым уретритом: результаты многоцентрового описательного исследования // Антибиотики и химиотерапия. – 2012. – Т. 57. № 5-6. – С. 32 – 40.
4. Баранова Н.Б. Персистенция *Mycoplasma hominis* у человека: восприимчивость к микоплазменной инфекции и ответные реакции микоплазмы на стрессоры: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.02.03 – Казань. - 2010. – 24 с.
5. Батурин В.А., Щетинин Е.В., Демиденко И.Ф., Базиков И.А., Куценко И.И. Уровень резистентности *Ureaplasma urealyticum* к противомикробным средствам // Медицинский Вестник Северного Кавказа. – 2012. - № 1. – С. 80 – 81.
6. Байтяков В.В., Сыркина М.Г., Радаева О.А. Антибиотикорезистентность культур *U.urealyticum* и *M.hominis*, полученных от жителей Республики Мордовия // Акушерство. Гинекология. – 2016. –Т. 93. №1. – С. 72 – 75.
7. Белова А.В., Асцатурова О.Р., Александров Л.С., Никонов А.П., Иванова Т.А., Гущин А.Е. Генитальные микоплазмы (*Ureaplasma parvum*, *Ureaplasma urealyticum*, *Mycoplasma hominis*, *Mycoplasma genitalium*) в развитии осложнений беременности, родов и послеродового периода // Архив

- акушерства и гинекологии им. В. Ф. Снегирева. – 2014. –Т.2. № 1. – С. 26 – 31.
8. Белова А.В., Никонов А.П. Генитальные микоплазмы (*U. parvum*, *U. urealyticum*, *M. hominis*, *M. genitalium*) в структуре инфекционных осложнений в акушерстве, гинекологии и перинатологии // Альманах клинической медицины. – 2015. - № 39. – С. 140 – 150.
9. Белькова Ю.А., Дехнич А.В., Козлов Р.С. Реальная практика терапии бактериальных инфекций, передаваемых половым путем, в России: результаты многоцентрового фармакоэпидемиологического исследования // Вестник дерматологии и венерологии. – 2011. - № 1. – С. 41 – 53.
10. Борхсениус С.Н., Чернова О.А., Чернов В.М., Вонский М.С. Микоплазмы. Молекулярная и клеточная биология, взаимодействие с иммунной системой млекопитающих, патогенность, диагностика // СПб: Наука. – 2002. – 319 с.
11. Борхсениус С.Н., Чернова О.А., Чернов В.М., Вишняков И.Е. Микоплазмы в биологии и медицине начала XXI века // СПб.: Наука. - 2016. - 333с.
12. Ваганова А.Н. Молекулярные основы устойчивости патогенных для человека микоплазм к фторхинолонам // Инфекция и иммунитет. - 2017. - Т. 7. - №3. - С. 231-244. doi: 10.15789/2220-7619-2017-3-231-244
13. Винарова Н.А., Фиев Д.Н., Винаров А.З. Значение микоплазм в заболеваниях мочеполовой системы // Фарматека. – 2008. - № 16. – С. 23 – 29.
14. Виноградова К.А., Булгакова В.Г., Полин А.Н., Кожевин П.А. Устойчивость микроорганизмов к антибиотикам: резистомы, её объём, разнообразие и развитие // Антибиотики и химиотерапия. – 2013. - № 58. – С. 38 – 48.
15. Гависова А.А., Твердикова М.А., Тютюнник В.Л. Современный взгляд на проблему уреаплазменной инфекции // Эффективная фармакотерапия. – 2013. - № 4. – С. 8 – 13.

16. Герасимова Н.А., Евстигнеева Н.П., Гушин А.Е. Диагностические аспекты количественной оценки урогенитальных микоплазм // Молекулярная диагностика 2014: Всероссийская научно-практическая конференция. - 2014. – Т. 1. – С. 176–177.
17. Герасимова Н.А., Евстигнеева Н.П., Зильберберг Н.В., Гушин А.Е. К вопросу о дискордантных результатах выявления *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma spp.* молекулярно-биологическим и культуральным методами у пациентов с урогенитальными заболеваниями // Фундаментальные исследования. -2014. - № 10. – С. 487 – 496.
18. Герасимова Н.М., Евстигнеева Н.П., Кузнецова Ю.Н. Урогенитальные инфекции как междисциплинарная проблема. Современные подходы к диагностике и лечению // Вестник последипломного медицинского образования. – 2009. - №1. – С. 17 – 19.
19. Гладин Д.П., Козлова Н.С., Эйдельштейн И.А., Мартинович А.А., Борухович Д.Г., Кириллова Н.П., Зачиняева А.В., Андреева А.Н., Комиссарова М.Ю. Микоплазмы. Биологические свойства (лекция) // Российские биомедицинские исследования. - 2023. - Т. 8. - №4. - С. 103–115. doi: 10.56871/RBR.2023.58.16.012
20. Говорун В.М. Молекулярные механизмы формирования резистентности к тетрациклинам и фторхинолонам у молликут: автореф. дисс. ... док. биол. наук: 03.00.04, 03.00.03. – М., 2000. – 60 с.
21. Голуб А.В., Козлов Р.С. Рациональная антибактериальная терапия – путь к сохранению активности антибиотиков // Инфекционные болезни. – 2015. - № 1. – С. 4 – 9.
22. Гомберг М.А. Ведение пациенток с воспалительными заболеваниями органов малого таза // Гинекология. – 2013. - № 6. – С. 12 -15.
23. Гусейнзаде М.И. Оптимизация методов диагностики и лечения микоплазменной инфекции у женщин репродуктивного возраста: дисс. ... канд. мед. наук: 14.01.01. – М., 2014. – 125 с.

24. Гуцин А.Е. Роль точечных мутаций в генах топоизомеразы IV и ДНК гиразы в формировании резистентности *Mycoplasma hominis* к фторхинолонам: дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.04. – 1999. – 102 с.
25. Евстигнеева Н.П., Кузнецова Ю.Н., Герасимова Н.М., Сергеев А.Г., Михайлова О.О., Резайкин А.В. Генетические различия штаммов *Mycoplasma hominis*, выделенных от женщин с воспалительными заболеваниями органов малого таза // Вестник дерматологии и венерологии. – 2009. - № 6. – С. 85 – 90.
26. Евстигнеева Н.П., Кузнецова Ю.Н., Рахматулина М.Р., Михайлова О.О. Новые медицинские технологии ведения пациентов с урогенитальной микоплазменной инфекцией // Врач. – 2011. - № 6. – С. 7 -12 .
27. Евстигнеева Н.П., Кузнецова Ю.Н., Рахматулина М.Р., Михайлова О.О. Тактика ведения пациенток с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта, ассоциированными с *M. hominis* // Российский вестник акушера-гинеколога. – 2011. - № 6. – С. 84 – 88.
28. Евстигнеева Н.П., Кузнецова Ю.Н. Клинико-лабораторное обоснование генотипирования изолятов микоплазм методом секвенирования участка гена 16S рРНК // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - 2014. - №8. – С. 33 - 37.
29. Егоров А.А., Стуколкина Н.Е., Чеботкевич В.Н. Клинико - эпидемиологические особенности микоплазменных инфекций урогенитального тракта // Вестник СПбГМА им. И. И. Мечникова. – 2007. - Т. 8. - № 4. – С. 165 – 168.
30. Занько А.С., Арестова И.М., Баркун Г.К. Структура акушерских и перинатальных осложнений у беременных с урогенитальным микoureapлазмозом // Охрана материнства и детства. – 2008. - № 1. – С. 25 – 31.
31. Заручейнова О.В., Вербов В.Н., Семенов Н.В. Сравнительная оценка чувствительности урогенитальных микоплазм *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma spp.* к антимикробным препаратам // Материалы научно-

практической конференции «От эпидемиологии к диагностике актуальных инфекций...». – 2014. – Т. 4. - № 1. – С. 67 – 67.

32. Заручейнова О.В. Методы лабораторной диагностики урогенитальных инфекций, ассоциированных с *Mycoplasma hominis* и *Ureaplasma* spp. // Инфекция и иммунитет. – 2014. - Т. 4. - № 4. – С. 331 -338/

33. Захаржевская Н.Б. Сравнительный анализ внешнемембранных везикул токсигенного и нетоксигенного штаммов *Bacteroides fragilis*: дис. канд. биологич. наук:. – М., 2017 - 161 с.

34. Землянко О.М., Рогоза Т.М., Журавлева Г.А. Механизмы множественной устойчивости бактерий к антибиотикам // Экологическая генетика. – 2018. – Т. 16. – N 3. – С. 4–17. doi: 10.17816/ecogen1634-17.

35. Зотова М.А., Тихонова С.С., Лебедева А.И., Багаев К.В. Выявление генитальных микоплазм у женщин репродуктивного возраста // Вестник Челябинского государственного университета. Биология. – 2013. - № 7. – С. 298 - 298.

36. Зубарева В.Д., Соколова О.В., Безбородова Н.А., Шкуратова И.А., Кривоногова А.С., Бытов М.В. Молекулярные механизмы и генетические детерминанты устойчивости к антибактериальным препаратам у микроорганизмов // СЕЛЬСКОХОЗЯЙСТВЕННАЯ БИОЛОГИЯ. – 2022. – Т.57, N 2. – С. 237-256. doi: 10.15389/agrobiology.2022.2.237

37. Карапетян Т.Э. Исходы беременности и генитальные микоплазмы // Гинекология. – 2017. – Т. 19, № 3. – С. 73 -76.

38. Катола В.М. Микоплазмы: биология, распространение и роль в патологии // Бюллетень патологии и физиологии дыхания. – 2018. – Т. 1. - №.69. – С. 50–54.

39. Кисина В.И., Ширшова Е.В. Существует ли связь генитальных микоплазм с патологией органов мочеполовой системы? // Гинекология. – 2005. – № 4. – С. 226 – 232.

40. Козлов Р.С. Резистентность к антимикробным препаратам как реальная угроза национальной безопасности // Русский медицинский журнал. – 2014. - № 4. – С. 321 – 323.
41. Колесникова Е.А., Бруснигина Н.Ф. Мониторинг антибиотикорезистентности *Ureaplasma urealyticum* и *Mycoplasma hominis*, ассоциированных с заболеваниями урогенитального тракта у женщин Нижнего Новгорода // В сборнике: Инновационные технологии в противоэпидемической защите населения. Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 95-летию ФБУН ННИИЭМ им. академика И.Н. Блохиной. ФБУН "Нижегородский НИИ эпидемиологии и микробиологии им. академика И.Н. Блохиной". - 2014. - С. 208-213
42. Колесникова Е.А., Бруснигина Н.Ф., Ефимов Е.И. Результаты многолетнего мониторинга антибиотикорезистентности генитальных микоплазм, выделенных у женщин и мужчин с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта // В сборнике: Современные технологии в эпидемиологическом надзоре за актуальными инфекциями. Материалы Всероссийской научно-практической конференции, посвященной 95-летию со дня рождения академика РАМН И.Н. Блохиной. Редакционная коллегия: Е.И. Ефимов, Г.И. Григорьева, Н.Н. Глухов, Е.Н. Филатова, В.В. Королева. - 2016. - С. 166-173.
43. Колесникова Е.А., Бруснигина Н.Ф., Ефимов Е.И. Молекулярно-биологическая характеристика бактерий родов *Ureaplasma* и *Mycoplasma*, ассоциированных с заболеваниями урогенитального тракта // Журнал МедиАль. - 2017. - № 2 (20). С. 57 - 64.
44. Колесникова Е.А., Бруснигина Н.Ф., Кленина Н.Н. Лекарственная устойчивость генитальных микоплазм, ассоциированных с инфекциями мочеполовой системы // Инфекционные болезни. - 2017. - Т. 15. - № S1. С. 130.
45. Колесникова Е.А., Бруснигина Н.Ф., Ефимов Е.И. оценка распространенности антибиотикорезистентных штаммов генитальных

микоплазм, выделенных у мужчин с воспалительными заболеваниями уrogenитального тракта // РМЖ. Медицинское обозрение. - 2018. - Т. 2. - № 2-1. С. 4-7.

46. Концепция демографической политики Российской Федерации на период до 2025 года / Указ Президента Российской Федерации от 09.10.2007г. № 1351.

47. Кубанова А.А., Рахматулина М.Р. Уrogenитальные инфекционные заболевания, вызванные генитальными микоплазмами. Клинические рекомендации // Вестник дерматологии и венерологии. – 2009. - № 3. – С. 78 – 82.

48. Кузнеченкова Т.В. Генитальная микоплазменная инфекция у женщин разных социальных групп // Вестник НГУ. Серия: Биология, клиническая медицина. - 2010. – Т. 8. - № 2. – С. 78 – 82.

49. Кузьменков А.Ю., Трушин И.В., Авраменко А.А., Эйдельштейн М.В., Дехнич А.В., Козлов Р.С. AMRmap: Интернет-платформа мониторинга антибиотикорезистентности // Клиническая Микробиология и Антимикробная Химиотерапия. – 2017. – Т. 19. - № 2. – С. 84 – 90.

50. Кузьмин В.Н., Гусейнзаде М.И. Эффективная антибактериальная терапия микоплазменной инфекции у женщин репродуктивного // Consilium Medicum. - 2014. - № 3. – С. 49 – 52.

51. Летяева О.И. Вопросы антибактериальной терапии воспалительных заболеваний уrogenитального тракта, ассоциированных с микоплазменной инфекцией, у женщин репродуктивного возраста // Современные проблемы дерматовенерологии, иммунологии и врачебной косметологии. – 2012. - № 4. – С. 30 – 37.

52. Лысенко О.В., Кузнеченкова Т.В., Игликов В.А., Дерябина В.П. Распространенность воспалительных заболеваний мочеполовых органов, ассоциированных с генитальными микоплазмами. Эффективность лечения // Вестник дерматологии и венерологии. – 2010. - № 2. – С. 83 – 88.

53. Мальцева Л.И., Зефирова Т.П., Лобова Л.А., Идиятуллина Э.Р., Фаттахова А.Р., Шишочкина И.М. Микоплазменная инфекция в акушерской и перинатальной патологии // Казанский медицинский журнал. – 2008. – Т. 86. – № 2. – С. 131 – 135 .
54. Марянян А.Ю., Протопопова Н.В., Дружинина Е.Б. Течение беременности у женщин с уреамикоплазменной инфекцией в зависимости от исхода лечения // Сибирский медицинский журнал. – 2011. - № 6. – С. 138 - 144.
55. Марянян А.Ю. Лечение уреамикоплазменной инфекции у беременных женщин // Сибирский медицинский журнал. – 2012. - № 5. – С. 120 -124.
56. Мустафина Л.Р., Мустафина Л.Р., Шведова М.В., Юрьев С.Ю., Логвинов С.В., Герасимов А.В., Потапов А.В., Варкута Е.Ю. Выраженность компенсаторных реакций в плацентах III триместра беременности при различных видах микоплазменного инфицирования // Сибирский медицинский журнал. – 2012. – Т. 27. - № 1. – С. 80 – 84.
57. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. – М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. – 91 с.
58. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Клинические рекомендации. – М.: Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии, 2015. – 162 с.
59. Пандырева О.Н., Аршинский М.И. Частота выявления микоплазм в урогенитальном тракте у беременных женщин методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) // Здравоохранение Дальнего Востока. – 2016. - № 4. – С. 43 – 47.
60. Перламутров Ю.Н., Чернова Н.И. Пути повышения эффективности терапии воспалительных заболеваний органов малого таза ассоциированных с микоплазменной инфекцией // Вестник дерматологии и венерологии. – 2011. - № 4. – С. 102 – 106.

61. Плахова К.И. Клиническое значение генетической вариабельности генитальных микоплазм // Вестник дерматологии и венерологии. – 2015. - № 2. – С. 76 – 83.
62. Погосян Г.П., Коновалова А.А., Акимова В.В. Сравнительный анализ распространенности различных видов микоплазм // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. – 2012. - № 1. – С. 99 – 101.
63. Потатуркина-Нестерова Н.И., Немова И.С., Магомедова А.М., Нестеров А.С. Патогенный потенциал микоплазм, эпидемиологически ассоциированных с воспалительными заболеваниями урогенитального тракта // Фундаментальные исследования. – 2012. - № 1. – С. 89 – 92.
64. Пуликов А.С., Перетяцько О.В. Терапевтический патоморфоз децидуальных клеток плаценты при уреаплазмозе во время беременности // Фундаментальные исследования. Медицинские науки. – 2015. - №1. – С. 337-341.
65. Раковская В.И. Микоплазмы и микоплазменные инфекции // Вестник дерматологии и венерологии. – 2008. - № 5. – С. 60 – 65.
66. Рахматулина Р.М. Урогенитальные заболевания, вызванные генитальными микоплазмами (*Mycoplasma genitalium*, *Ureaplasma spp.*, *Mycoplasma hominis*) // ConsiliumMedicum. – 2012. – Т. 14. - № 2. – С. 2 – 5.
67. Рахматулина М.Р., Кириченко С.В. Современные представления о генетической вариабельности генитальных микоплазм и их роли в развитии воспалительных заболеваний мочеполовой системы // Вестник дерматологии и венерологии. – 2013. - № 3. – С. 17 – 25.
68. Рахматулина М.Р., Плахова К.И., Кубанов А.А. Генетические варианты генитальных микоплазм и их взаимосвязь с клиническим течением воспалительных заболеваний мочеполовой системы у женщин // Вестник дерматологии и косметологии. – 2014. - № 6. – С. 107 -113.
69. Рахматулина М.Р., Плахова К.И., Игонина О.Н. Генетические варианты *Ureaplasma spp.* и их роль в развитии воспалительных заболеваний

мочеполовой системы // Вестник дерматологии и косметологии. – 2014. - № 3. – С. 79 -84.

70. Рищук С.В., Мирский В.Е. Диагностические подходы при урогенитальной микоплазменной инфекции // Всероссийский междисциплинарный медицинский журнал. – 2013. - № 1. – С. 4 – 12.

71. Рищук С.В., Душенкова Т.А. Оптимизация диагностики репродуктивно значимых инфекций у половых пар // Всероссийский междисциплинарный медицинский журнал. – 2013. - №4. – С. 20 – 33.

72. Рищук С.В., Гриценко В.А., Важбин Л.Б., Ахунова Н.Р., Кахиани Е.И., Душенкова Т.А., Базылева А.В. Презентация методических рекомендаций ВОЗ по урогенитальной микоплазменной инфекции с комментариями авторов //Бюллетень Оренбургского научного центра УрОРАН. [Электронныйресурс] (URL: <http://elmag.uran.ru:9673/magazine/Numbers/2016-1/Articles/SVR-2016-1.pdf>). - 2016. -№ 1. – 29 с.

73. Руденкова Т.В., Дорошевич В.В., Костюк С.А., Андреева Н.Л., Бадыгина Н.А., Полуян О.С. Микробиологические свойства и генетические особенности микоплазм // Медицинские новости. – 2011. - № 8. – С. 13 – 16.

74. Руденкова Т.В., Кулага О.К., Костюк С.А., Шишпоренок Ю.А., Рубаник Л.В. Изучение устойчивости-чувствительности *Mycoplasma genitalium* к антибактериальным препаратам // Медицинский журнал. – 2013. –Т.46. - № 4. – С. 93 - 95.

75. Руководство EUCAST по выявлению механизмов резистентности и резистентности, имеющей особое клиническое и/или эпидемиологическое значение Редакция 1.0 [Электронный ресурс] Режим доступа: <http://www.antibiotic.ru/minzdrav/files/docs/eucast-guideline-on-detection-of-resistance-mechanisms-1.0-rus.pdf>

76. Румянцева Т.А., Гуцин А.Е. Условно - патогенные микоплазмы и бактериальный вагиноз: взаимосвязь, требующая изменений в подходах к лечению пациенток // Молекулярная диагностика 2017. Раздел 7.

Современные подходы к молекулярной диагностике инфекций органов репродукции. – 2017. – Т. 1. – С. 374 - 375.

77. Рыжих П.Г., Гуцин А.Е. Распространение штаммов *Mycoplasma genitalium*, имеющих мутацию резистентности к макролидам, на территории Российской Федерации (Москвы) // Молекулярная диагностика 2014: Всероссийская научно-практическая конференция. - 2014. – Т. 1. – С. 174–175.

78. Савичева А.М., Шипицына Е.В., Башмакова М.А. Генитальные микоплазмы – проблемы диагностики и лечения // Клиническая дерматология и венерология. – 2008. – № 6. – С. 80–90.

79. Савичева А.М., Прилепская В.Н., Соколовский Е.В., Кисина В.И., Гуцин А.Е., Забиров К.И. Роль микоплазм в урогенитальной патологии женщин и их половых партнеров // Журнал акушерства и женских болезней. – 2010. – Т.107. - № 1. – С. 11 – 21.

80. Савичева А.М. Современные представления о генитальных микоплазмах // Мать и дитя. - 2010. – Т. 18. - № 4. – С. 183 - 186.

81. Савичева А.М. Микробиологические исследования в диагностике репродуктивно значимых инфекций: прогресс за 20 лет // Журнал акушерства и женских болезней. – 2010. – Т.109, № 1. – С. 45 – 50.

82. Савичева А.М. Инфекции матери, плода и новорожденного // Педиатр. – 2014. – Т. 5, № 3. – С. 1- 8.

83. Светличная Т.Г., Мосягин И.Г., Губерницкая С.В. Клинико-эпидемиологическая характеристика хламидийной и микоплазменной инфекций как факторов риска для сексуального и репродуктивного здоровья // Экология человека. – 2012. - № 2. – С. 40 – 46.

84. Сидоренко С.В., Тишков В.И. Молекулярные основы резистентности к антибиотикам // Успехи биологической химии. – 2004. – Т.4. – С. 263 – 306.

85. Сорока А.Е., Акопиан Т.А., Тараскина А.М., Савичева А.М., Говорун В.М. Генетическая характеристика клинических изолятов *Mycoplasma*

- hominis*, устойчивых к тетрациклинам // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. Приложение 1. – 2001. - № 3. – С. 35 – 35.
86. Сорока А.Е., Акопиан Т.А., Тараскина А.М., Савичева А.М., Говорун В.М. Интеграция гена *tet(M)* в геном *M. hominis* и молекулярное картирование конъюгативного транспозона *Tn916* // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. Приложение 1. – 2002. - Т.4 – С. 43 – 43.
87. Сорока А.Е. Особенности интеграции *tet(M)* детерминанты в геном *M. hominis*: автореф. дисс. ... канд. биол. наук: 03.00.04 - М., 2002. – 26с.
88. Стратегия предупреждения распространения антимикробной резистентности в Российской Федерации на период до 2030 года / Распоряжение Правительства Российской Федерации от 25.09.2017г. №2045-р.
89. Стуколкина Н.Е. Современные аспекты биологии микоплазм // Вестник Новгородского государственного университета. – 2005. - № 32. – С. 58 – 62.
90. Тарабрина Е.П., Потатуркина-Нестерова Н.И. Ассоциация миомы матки с инфицированностью уреоплазмами // Казанский медицинский журнал. – 2009. – Т. 90. - № 3. – С. 408 – 411.
91. Торчинов А.М., Мазуркевич М.В. Смешанные урогенитальные инфекции у женщин: диагностика и комплексная терапия // Гинекология. – 2008. – Т. 10. - №6. – С. 38 – 41.
92. Фофанова И.Ю. Урогенитальные микоплазмы и акушерско-гинекологическая патология // Акушерство и гинекология. – 2010. - № 3. – С. 13 – 17.
93. Фофанова И.Ю., Прилепская В.Н. Современные представления об урогенитальной микоплазменной инфекции // Гинекология. – 2014. – Т. 16. - № 2. – С. 4 - 8.

94. Хайтович А.Б. Подходы к решению проблемы лекарственной устойчивости в мире и Российской Федерации // Крымский журнал экспериментальной и клинической медицины. – 2018.- Т. 8, N 2. – С. 81 – 95.
95. Херувимова Е.С., Артюхов В.Г., Резван С.Г. Изучение уровня чувствительности урогенитальных микоплазм к действию антибактериальных препаратов различной природы // Вестник ВГУ. Серия: Химия, Биология, Фармация. – 2010. - № 2. – С. 115 -119.
96. Хрисанова С.И. Распространенность хламидийной инфекции, уреаплазмоза и микоплазмоза среди некоторых групп населения // Здравоохранение Чувашии. – 2011. - № 2. – С. 55 – 60.
97. Хрянин А.А., Решетников О.В. Современные представления о *Mycoplasma genitalium* // Русский медицинский журнал. Секция Мать и Дитя. – 2008. – Т. 16. - № 19. – С. 1236 – 1239.
98. Хулуп Г.Я., Костюк С.А., Бадыгина Н.А., Исмаил М.А. Определение концентрации ДНК мико" и уреаплазм у беременных при инфекциях родовых путей методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (real"time PCR) // Иммунопатология, аллергология, инфектология. – 2004. - № 3. – С. 84 – 89.
99. Шипицына Е.В., Савичева А.М., Бенькович А.С., Соколовский Е.В. *Mycoplasma genitalium* как возбудитель инфекций урогенитального тракта: патогенез, клиника, диагностика и лечение // Журнал акушерства и женских болезней. – 2008. – Т. 107. - № 2. – С. 111 – 120.
100. Чернова О.А., Медведева Е.С., Музыкантов А.А., Баранова Н.Б., Чернов В.М. Микоплазмы и их устойчивость к антибиотикам: проблемы и перспективы контроля микоплазменных инфекций и контаминаций клеточных культур // АСТА NATURAE (РУССКОЯЗЫЧНАЯ ВЕРСИЯ). – 2016. – Т. 8. - № 2 (29). – С. 27 – 38.
101. Чернов В.М., Чернова О.А., Баранова Н.Б., Медведева Е.С., Шаймарданова Г.Ф., Горшков О.В. Адаптация микоплазм к стрессовым условиям: особенности изменений протеома у *Mycoplasma hominis* PG37 при

голодании и пониженной температуре среды // Молекулярная биология. – 2011. – Т. 45. - № 5. – С. 914 - 923.

102. Чернов В.М., Чернова О.А., Санчес – Вега Х.Т., Колпаков А.И., Ильинская О.Н. Микоплазменные контаминации клеточных культур: везикулярный трафик у бактерий и проблема контроля инфектогенов / В.М. Чернов, // АСТА NATURAE. - 2014. – Т. 6. - № 3(22). – С. 43 – 54.

103. Чернов В.М., Музыкантов А.А., Баранова Н.Б., Чернова О.А. Внеклеточные везикулы бактерий – медиаторы межклеточной коммуникации: практические приложения и инновационные технологии (обзор) // Прикладная биохимия и микробиология. - 2023. - Т. 59. - №2. - С. 107-119. doi: 10.31857/S0555109923020046

104. Чхартишвили М., Воробьева Н., Шипицына Е.В., Савичева А.М. Фторхинолоны в лечении урогенитальных инфекций, ассоциированных с уреapлазмами // Врач. – 2009. - № 6. – С. 33 – 35.

105. Эйдельштейн И.А., Руднева Н.С., Романов А.В., Зубарева Л.М., Кузьменков А.Ю., Колесникова Е.А., Трушин И.В., Борисов И.В., Суханова Л.Н., Ахмедова А.М., Новикова О.П., Козлов Р.С. *Mycoplasma genitalium*: мониторинг распространения мутаций, связанных с резистентностью к макролидам в России // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия. – 2022. – Т. 24. - №1. – С. 52 - 60. doi: 10.36488/смас.2022.1.52-60.

106. Юрьев С.Ю., Аббасова В.И., Девятьярова Л.Л., Гуцин А.Е. К вопросу о специфичности влияния *Mycoplasma genitalium* на течение беременности // Гинекология. – 2014. – Т. 11. - № 4. – Р. 18 – 24.

107. Alcock B.P., Raphenya A.R., Lau T.T.Y., Tsang K.K., Bouchard M., Edalatmand A., Huynh W., Nguyen A.V., Cheng A.A., Liu S., Min S.Y., Miroshnichenko A., Tran H.K., Werfalli R.E., Nasir J.A., Oloni M., Speicher D.J., Florescu A., Singh B., Faltyn M., Hernandez-Koutoucheva A., Sharma A.N., Bordeleau E., Pawlowski A.C., Zubyk H.L., Dooley D., Griffiths E., Maguire F., Winsor G.L., Beiko R.G., Brinkman F.S.L., Hsiao W.W.L., Domselaar G.V.,

McArthur A.G. CARD 2020: antibiotic resistance surveillance with the comprehensive antibiotic resistance database // Nucleic Acids Res. – 2020. – Vol. 8, No 48. – P. 517- 525. doi: 10.1093/nar/gkz935.

108. Aziz R.K., Bartels D., Best A.A., DeJongh M., Disz T., Edwards R.A., Formsma K., Gerdes S., Glass E.M., Kubal M., Meyer F., Olsen G.J., Olson R., Osterman A.L., Overbeek R.A., McNeil L.K., Paarmann D., Paczian T., Parrello B., Pusch G.D., Reich C., Steven R., Vassieva O., Vonstein V., Wilke A., Zagnitko O. The RAST server: rapid annotations using subsystems technology // BMC Genomics. – 2008. – Vol. 9. – P.75.

109. Azizmohammadi S., Azizmohammadi S. Antimicrobial Susceptibility Patterns of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* Isolated From Pregnant Women // Iran Red Crescent Med J. – 2015. – Vol.12. – N.17. doi: 10.5812/ircmj.17211.

110. Bayraktar M.R., Ozerol I.H., Gucluer N., Celi O. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in pregnant women // International Journal of Infectious Diseases. – 2010. – N. 14. – P. 90 - 95.

111. Balish M., Bertaccini A., Blanchard A., Brown D., Browning G., Chalker V., Frey J., Gasparich G., Hoelzle L., Knight T., Knox C., Kuo C.H., Manso-Silván L., May M., Pollack J.D., Ramírez A.S., Spergser J., Taylor-Robinson D., Volokhov D., Zhao Y. Recommended rejection of the names *Malacoplasma* gen.nov., *Mesomycoplasma* gen.nov., *Metamycoplasma* gen.nov., *Metamycoplasmataceae* fam.nov., *Mycoplasmoidaceae* fam.nov., *Mycoplasma ooidales* ord.nov., *Mycoplasmoides* gen.nov., *Mycoplasmaopsis* gen. nov // Int J Syst Evol Microbiol. – 2019. – V. 69. – N.11. – P.3650-3653. doi: 10.1099/ijsem.0.003632.

112. Be'be'ar C.M., Bove J.M., Be'be'ar C., Renaudin J. Characterization of *Mycoplasma hominis* Mutations Involved in Resistance to Fluoroquinolones // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1997. - Vol. 41. – N.2. – P. 269 - 273.

113. Be'be'ar C.M., Charron A., Bove J.M., Be'be'ar C., Renaudin H. Cloning and Nucleotide Sequences of the Topoisomerase IV *parC* and *pare* Genes of *Mycoplasma hominis* // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1998. - Vol. 42. – N. 8. – P. 2024 - 2031.
114. Be'be'ar C.M., Renaudin J., Charron A., Renaudin H., Barbeyrac B. de, Schaefferbeke Th., Be'be'ar C. Mutations in the *gyrA*, *parC*, and *pare* Genes Associated with Fluoroquinolone Resistance in Clinical Isolates of *Mycoplasma hominis* // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1999. - Vol. 43. – N. 4. – P. 954 -956.
115. Be'be'ar C.M., Grau O., Charron A., Renaudin H., Gruson D., Be'be'ar C. Cloning and Nucleotide Sequence of the DNA Gyrase (*gyrA*) Gene from *Mycoplasma hominis* and Characterization of Quinolone-Resistant Mutants Selected In Vitro with Trovafloxacin // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2000. - Vol. 44. – N. 10. – P. 2719 – 2727.
116. Be'be'ar C.M., Renaudin H., Charron A., Gruson D., Lefrancois M., Be'be'ar C. In Vitro Activity of Trovafloxacin Compared to Those of Five Antimicrobials against Mycoplasmas Including *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* Fluoroquinolone-Resistant Isolates That Have Been Genetically Characterized // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. - 2000. - Vol. 44. - N. 9. – P. 2557 – 2560.
117. Be'be'ar C.M., Renaudin H., Charron A., Clerc M., Pereyre S., Be'be'ar C. DNA Gyrase and Topoisomerase IV Mutations in Clinical Isolates of *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis* Resistant to Fluoroquinolones // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2003. - Vol. 47. – N. 10. – P. 3323 – 3325.
118. Beeton M.L., Chalker V.J., Kotecha S., Spiller O.B. Comparison of full *gyrA*, *gyrB*, *parC* and *parE* gene sequences between all *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* serovars to separate true fluoroquinolone antibiotic resistance mutations from non-resistance polymorphism // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2009. – N. 64. – P. 529 – 538.

119. Beeton M.L., Chalker V.J., Jones L.C., Maxwell N.C., Spiller O.B. Antibiotic Resistance among Clinical *Ureaplasma* Isolates Recovered from Neonates in England and Wales between 2007 and 2013 // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2016. – Vol. 60. - N. 1. – P. 52 – 56.
120. Boujemaa S., Allaya A.B., Mlik B., Mardassi H., Mardassi B.A. Phylogenetics of *Mycoplasma hominis* clinical strains associated with gynecological infections or infertility as disclosed by an expanded multilocus sequence typing scheme // Sci Rep. - 2018. - Vol. 8. - N. 1. - P. 14854. doi: 10.1038/s41598-018-33260-x
121. Chalker V.J., Sharratt M.G., Rees C.L., Bell O.H., Portal E., Sands K., Payne M.S., Jones L.C., Spiller O.B. Tetracycline resistance mediated by tet(M) has variable integrative conjugative element composition in *Mycoplasma hominis* strains isolated in the United Kingdom from 2005 to 2015. Antimicrob Agents Chemother 65:e02513-20. – 2021. Vol. 65. – N. 4. – P. 1 – 12. doi.org/10.1128/AAC.02513-20.
122. Charity Ezeanya-Bakpa C., Agbakoba R.N., Oguejiofor B.C., Enweani-Nwokelo B.I. Sequence analysis reveals asymptomatic infection with *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* possibly leads to infertility in females: A cross-sectional study // Int J Reprod Biomed. – 2021. - Vol. 13. – N. 19(11). - P. 951 - 958. doi: 10.18502/ijrm.v19i11.9910
123. Charron A., Barbeyrac B., Renaudin H., Geniaux M., BeMar C. *Mycoplasma genitalium* as etiological agent of male urethritis in Southwest France // In: abstracts of the 11th meeting of the International Society for STD Research (New Orleans). – 1995. – 203 s.
124. Chernov V.M., Chernova O.A., Mouzykantov A.A., Medvedeva E.S., Baranova N.B., Malygina T.Y., Aminov R.I., Trushin M.V., Antimicrobial resistance in mollicutes: known and newly emerging mechanisms // FEMS Microbiology Letters. - 2018. - V. 365, - N. 18. fny185. doi.org/10.1093/femsle/fny185

125. Chernov V.M., Chernova O.A., Mouzykantov A.A., Lopukhov L.L., Aminov R.I. Omics of antimicrobials and antimicrobial resistance // *Expert Opinion on Drug Discovery*. – 2019. – V. 14(5). – P. 455–468. doi.org/10.1080/17460441.2019.1588880
126. Chernova O.A., Chernov V.M., Mouzykantov A.A., Baranova N.B., Edelstein I.A., Aminov R.I.. Antimicrobial drug resistance mechanisms among Mollicutes // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2020. - V. 57. – N. 2. - P. 106253. doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.106253
127. Citti C., Dordet-Frisoni E., Nouvel L.X., Kuo C.H., Baranowski E. Horizontal Gene Transfers in Mycoplasmas (Mollicutes) // *Curr. Issues Mol. Biol.* – 2018. No 29. – P. 3 - 22. doi.org/10.21775/cimb.029.003.
128. Dando S.J., Nitsos I., Kallapur S.G. [et al.] The role of the multiple banded antigen of *Ureaplasma parvum* in intra amniotic infection: major virulence factor or decoy? // *PLoS One*. – 2012. – Vol. 7. – N. 1. - e29856.
129. De'grange S., Renaudin H., Charron A., Be'be'ar C., Be'be'ar C.M. Tetracycline Resistance in *Ureaplasma* spp. and *Mycoplasma hominis*: Prevalence in Bordeaux, France, from 1999 to 2002 and Description of Two *tet(M)*-Positive Isolates of *M. hominis* Susceptible to Tetracyclines // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2008. - Vol. 52. –N. 2. –P. 742 – 744.
130. Depardieu F., Patrice C. Mutation in 23S rRNA Responsible for Resistance to 16-Membered Macrolides and Streptogramins in *Streptococcus pneumoniae* // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2001. - Vol. 45. – N. 1. –P. 319 – 323.
131. Dhandayuthapani S., Blaylock M.W., Be'be'ar C.M., Rasmussen W.G., Baseman J.B. Peptide Methionine Sulfoxide Reductase (MsrA) Is a Virulence Determinant in *Mycoplasma genitalium* // *Journal of Bacteriology*. – 2011. - Vol. 183. – N. 19. –P. 5645 – 5650.
132. Douthwaite S., Aagaard C. Erythromycin binding is reduced in ribosomes with conformational alterations in the 23S rRNA peptidyl transferase loop // *J. Mol. Biol.* - 1993. –N. 232. – P. 725–731.

133. Dongya M., Wencheng X., Xiaobo M., Lu W. Transition mutations in 23S rRNA account for acquired resistance to macrolides in *Ureaplasma urealyticum* // Microb. Drug Resist. – 2008. – Vol. 14. – N. 3. – P. 183 - 186.
134. Dridi L., Tankovic J., Petit J-C. CdeA of *Clostridium difficile*, a new multidrug efflux transporter of the MATE family // J. Microb Drug Resist. – 2004. – Vol. 10, N. 3. – P. 191-196. doi: 10.1089/mdr.2004.10.191.
135. Edelstein I.A., Romanov A.V., Edelstein M.V., Zubareva L.M., Rudneva N.S., Borisov I.V., Kolesnikova E.A., Sukhanova L.N., Achmedova A.M., Kozlov R.S. Prevalence of macrolide resistance in *Mycoplasma genitalium* from patients with non-gonococcal urethritis and cervicitis in Russia // 28th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID). 2018. P. 1863.
136. Ekiel A., Aptekorz M., Kłuciński P., Smolec D., Wiechuła B., Józwiak J., Martirosian G. Prevalence of Urogenital Mycoplasmas Among Men with NGU in Upper Silesia, Poland. Preliminary Study // Polish Journal of Microbiology. – 2016. - Vol. 65. – N. 1. – P. 93 – 95.
137. Farahani L., Tharakan T., Yap T., Ramsay J.W., Jayasena C.N., Minhas S. The semen microbiome and its impact on sperm function and male fertility: A systematic review and meta-analysis // Andrology. – 2021. - Vol. 9. - N. 1. - P. 115 - 144. doi: 10.1111/andr.12886
138. Fernandez L., Robert E., Hancock W. Adaptive and Mutational Resistance: Role of Porins and Efflux Pumps in Drug Resistance // Clinical Microbiology Reviews. – 2012. - Vol. 25. – N. 4. –P. 661 – 681.
139. Fernandez J., Karau M.J., Cunningham S.A., Greenwood-Quaintance K.E., Patel R. Antimicrobial Susceptibility and Clonality of Clinical *Ureaplasma* Isolates in the United States // Antimicrobial Agents and Chemotherapy – 2016. - Vol. 60. – N. 8. – P. 4793 – 4798.
140. Foschi C., Salvo M., Galli S., Moroni A., Cevenini R., Marangoni A. Prevalence and antimicrobial resistance of genital Mollicutes in Italy over a two-year period // [Электронный ресурс] Режим доступа: www.newmicrobiologica.org/PUB/allegati.../496N011.pdf.

141. Glass J.I., Assad-Garcia N., Alperovich N. [et al.] Essential genes of a minimal bacterium // Proc Natl Acad Sciences. USA. - 2006. – N. 103.-P. 425 - 430.
142. Gould S.B., Garg S.G., Martin W.F. Bacterial Vesicle Secretion and the Evolutionary Origin of the Eukaryotic Endomembrane System // Trends Microbiol. – 2016. – V. 24. – N.7. – P. 525-534. doi: 10.1016/j.tim.2016.03.005.
143. Govender S., Gqunta K., Roux M.I., Villiers B.D., Chalkley L.J. Antibiotic susceptibilities and resistance genes of *Ureaplasma parvum* isolated in South Africa // J. Antimicrob Chemother. – 2012. – Vol. 67. – N. 12. – P. 2821 – 2824.
144. Gupta R.S., Sawnani S., Adeolu M., Alnajar S., Oren A. Phylogenetic framework for the phylum Tenericutes based on genome sequence data: proposal for the creation of a new order Mycoplasmodales ord. nov., containing two new families Mycoplasmodaceae fam. nov. and Metamycoplasmataceae fam. nov. harbouring *Eperythrozoon*, *Ureaplasma* and five novel genera // Antonie Van Leeuwenhoek. – 2018. – V. 111. – N.9. – P. 1583-1630. doi: 10.1007/s10482-018-1047-3.
145. Gupta R.S., Oren A. Necessity and rationale for the proposed name changes in the classification of *Mollicutes* species. Reply to: 'Recommended rejection of the names *Malacoplasma* gen. nov., *Mesomycoplasma* gen. nov., *Metamycoplasma* gen. nov., *Metamycoplasmataceae* fam. nov., *Mycoplasmodaceae* fam. nov., *Mycoplasmodales* ord. nov., *Mycoplasmodes* gen. nov., *Mycoplasmaopsis* gen. nov // Int J Syst Evol Microbiol. – 2020. – V. 70. – N.2. – P. 1431-1438. doi: 10.1099/ijsem.0.003869.
146. Ikeh E., Ebie M., Allanana J., Oluwle J., Idika N. Isolation, Characterization and Antibiotic Susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* from Infertile and Pregnant Women in Lagos, Nigeria // Microbiology Research Journal International. – 2017. - Vol.20. – N. 1. – P. 1 – 7.
147. Janier M., Lassau F., Casin I. [et al.] Male urethritis with and without discharge: a clinical and microbiological study // Sex Transm Dis. – 1995. – N. 22. – P. 244 - 252.

148. Jensen J.S., Bradshaw C.S., Tabrizi S.N., Fairley C.K., Hamasuna R. Azithromycin Treatment Failure in *Mycoplasma genitalium*–Positive Patients with Nongonococcal Urethritis Is Associated with Induced Macrolide Resistance // Clinical Infectious Diseases. – 2008. – N. 47. – P. 1546 – 1553.
149. Jironkin A., Brown R.J., Underwood A., Chalker V.J., Spiller O.B. Genomic determination of minimum multi-locus sequence typing schemas to represent the genomic phylogeny of *Mycoplasma hominis* // BMC Genomics. - 2016. - Vol. 17. - N. 1. - P. 964. doi: 10.1186/s12864-016-3284-z.
150. Jolley K.A., Bray J.E., Maiden M.C.J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications // Wellcome Open Res. – 2018. - Vol. 3, N. 124. doi: 10.12688/wellcomeopenres.14826.1. PMID: 30345391; PMCID: PMC6192448.
151. Kaatz G.W, McAleese F., Seo S.M. Multidrug resistance in *Staphylococcus aureus* due to overexpression of a novel multidrug and toxin extrusion (MATE) transport protein // J. Antimicrob Agents Chemother. – 2005. - Vol. 49, N. 5. – P.1857 - 1864. doi: 10.1128/AAC.49.5.1857-1864.2005.
152. Kaatz G.W., DeMarco C.E., Seo S.M. MepR, a repressor of the *Staphylococcus aureus* MATE family multidrug efflux pump MepA, is a substrate-responsive regulatory protein // J. Antimicrob Agents Chemother. – 2006. – Vol. 50, No 4. – P.1276 - 1281. doi: 10.1128/AAC.50.4.1276-1281.2006.
153. Kamiya Y., Shimada Y., Ito S., Kikuchi M., Yasuda M., Kawamura Y., Deguchi T. Analysis of the quinolone-resistance determining region of the *gyrA* gene and the analogous region of the *parC* gene in *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* detected in first-void urine of men with non-gonococcal urethritis // J. Antimicrob Chemother. – 2013. – P. 481 – 482. - doi:10.1093/jac/dks417 .
154. Kawai Y., Nakura Y., Wakimoto T., Nomiya M., Tokuda T., Takayanagi T. [et al.] *In Vitro* Activity of Five Quinolones and Analysis of the Quinolone Resistance-Determining Regions of *gyrA*, *gyrB*, *parC*, and *pare* in *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* Clinical Isolates from Perinatal Patients in

Japan // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2015. -Vol. 59. – N. 4. – P. 2358 – 2364.

155. Kechagia N., Bersimis S., Chatzipanagiotou S. Incidence and antimicrobial susceptibilities of genital mycoplasmas in outpatient women with clinical vaginitis in Athens, Greece // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2008. - № 62. – P. 122 – 125.

156. Kouegnigan R.L., Ndong J.C., Medzegue S., Elisee-Ndam M., DjobaSiawaya J.F. Genital Mycoplasma infections and their resistance phenotypes in an African setting // Eur J ClinMicrobiol Infect Dis.- 2015.- Vol. 34. – N. 6. – P. 1087 – 1090.

157. Kong F., Ma Z., James G. [et al.] Species identification and subtyping of *Ureaplasma parvum* and *Ureaplasma urealyticum* using PCR-based assays // ClinMicrobiol. – 2000. - Vol. 3. – N. 38. – P.1175 - 1179.

158. Kong F., Gilbert G.L. Postgenomic taxonomy of human *Ureaplasma* a case study based on multiple gene sequences // Syst Evolution Microbiol. – 2004. – N. 54. - P. 1815 - 1821.

159. Krausse R., Schubert S. In-Vitro activities of tetracyclines, macrolides, fluoroquinolones and clindamycin against *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma* ssp. Isolated in Germany over 20 years // Clinical Microbiology and Infection. – 2010. – Vol. 16. – N. 11. – P. 1649 – 1655.

160. Lackey P.C., Ennis D.M., Cassell G.H., Whitley R.J., Hook E.W. The etiology of nongonococcal urethritis [abstract 238] // Clin Infect Dis. – 1995. – N. 21. –759s.

161. Ladefoged S.A., Christiansen G. Physical and genetic mapping of the genomes of five *Mycoplasma hominis* strains by pulsed-field gel electrophoresis //J. Bacteriol. -1992. – N. 174. - P.2199 - 2207.

162. Le Roy Ch., Hénin N., Pereyre S., Bébéar C. Fluoroquinolone-Resistant *Mycoplasma genitalium*, Southwestern France // Emerging Infectious Diseases. – 2016. – Vol. 22. – N. 9. – P. 1677 – 1679.

163. Lee M.Y., Kim M.H., Lee W.In., Kang So Y., La Y. Jeon Prevalence and Antibiotic Susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in Pregnant Women // Yonsei Med J. – 2016. - Vol. 5. – N. 57. – P. 1271 – 1275.
164. Leli Ch., Mencacci A., Bombaci J.C., D'Alò F., Farinelli S., Vitali M., Montagna P., Bietolini Cr., Meucci M., Perito St., Bistoni Fr. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in a population of Italian and immigrant outpatients // Le Infezioni in Medicina. – 2012. –N. 2. – P. 82 – 87.
165. Leonor D.R., Cabrera E.L., Núñez T.F., López I.I., Pérez Y.T., Rodríguez Ya.O., Rivero Ya.R. Frequency and Antimicrobial Sensitivity of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in Patients with Vaginal Discharge // MEDICC Review. – 2013. – Vol. 15. – N. 4. – P. 44 – 47.
166. Lu C., Ye T.I., Zhu G.X., Feng P.Y., Man H., Lu R.B., Lai W. Phenotypic and genetic characteristics of macrolide and lincosamide resistant *Ureaplasma urealyticum* isolated in Guangzhou, China // CurrMicrobiol. – 2010. – N. 61. – P. 44 – 49.
167. Ma L., Jensen J.S. [et al.] Genetic Variation in the Complete MgPa Operon and Its Repetitive Chromosomal Elements in Clinical Strains of *Mycoplasma genitalium* // PLoS One. – 2010. – Vol. 5. – N. 12. P. 156 - 160.
168. Mardassi B.B., Ayari H., Béjaoui-Khiari A. [et al.] Genetic variability of the P120' surface protein gene of *Mycoplasma hominis* isolates recovered from Tunisian patients with uro-genital and infertility disorders // BMC Infect Dis.- 2007. - Vol. 5. – N. 7. – P.142 - 146.
169. Mares M., Nastasa V., Doroftei B., Chifiriuc M.C., Bleotu C., Socolov D. Antibiotic susceptibility profiles of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* Isolated during a population-based study concerning women infertility in northeast Romania // Brazilian Journal of Microbiology. – 2011. – N. 42. – P. 256 -260.
170. Mariscal A.M., Kakizawa S., Hsu J.Y., Tanaka K., González-González L., Broto A., Querol E., Lluch-Senar M., Piñero-Lambea C., Sun L., Weyman P.D.,

- Wise K.S., Merryman C., Tse G., Moore A.J., Hutchison C.A., Smith H.O., Tomita M., Venter J.C., Glass J.I., Piñol J., Suzuki Y. Tuning Gene Activity by Inducible and Targeted Regulation of Gene Expression in Minimal Bacterial Cells // ACS Synthetic Biology. – 2018. – V. 7. – N. 6. – P. 1538-1552. doi.org/10.1021/acssynbio.8b00028.
171. Meng D.Y., Sun C.J., Yu J.B., Ma J., Xue W.C. Molecular mechanism of fluoroquinolones resistance in *Mycoplasma hominis* clinical isolates // Brazilian Journal of Microbiology. – 2014. – Vol. 45. – N. 1. P. 239 - 242.
172. Medvedeva E.S., Mouzykantov A.A., Kostenko V.V., Baranova N.B., Markelova M.I., Sabouni R.G., Khusnutdinova D.R., Chernova O.A., Chernov V.M. Adaptation to antimicrobials and pathogenicity in Mycoplasmas: development of ciprofloxacin-resistance and evolution of virulence in *Acholeplasma laidlawii* // Doklady Biochemistry and Biophysics. - 2021. - V. 501. - N. 1. - P. 444-448.
173. Moorthie S., Mattocks C.J., Wright C.F. Review of massively parallel DNA sequencing technologies // Hugo J. - 2011. – N. 5. - P. 1–12.
174. Mouzykantov A., Medvedeva E., Baranova N., Chernova O., Chernov V. Data on proteomic profiling of extracellular vesicles of *Acholeplasma laidlawii* strains with increased resistance to antibiotics of different classes - ciprofloxacin and tetracycline // Data in Brief. – 2020. – V. 32. – P. 106049. doi.org/10.1016/j.dib.2020.106049.
175. Kumar K., Golosova O., Fursov M. Unipro UGENE: a unified bioinformatics toolkit // J. Bioinformatics. – 2012. – N. 28. – P. 1166 - 1167. doi:10.1093/bioinformatics/bts091.
176. Kumar S., Stecher G., Tamura K. MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 7.0 for bigger datasets // Mol. Biol. Evol. – 2016. – Vol.33, No 7. – P. 1870–1874.
177. Kareek C.S., Smoczynski R., Tretyn A. Sequencing technologies and genome sequencing // J. Appl. Genetics. - 2011. - Vol. 52. – N. 4. - P. 413–435.

178. Payne M.S., Feng Z., Li S., Doherty D.A., Xu B., Li J. [et al.] Second trimester amniotic fluid cytokine concentrations, Ureaplasma sp. colonisation status and sexual activity as predictors of preterm birth in Chinese and Australian women // BMC Pregnancy and Childbirth. – 2014. – Vol. 14. – N. 340. – P. 1 – 11.
179. Paulsen L.K., Paulsen L.K., Dahl M.L., Skaare D., Grude N. Forekomst av *M. genitalium* of *U. urealyticum* i urin testet for *C. trachomatis* // Tidsskr Nor Legeforen nr. 2.- 2016.- N. 136. - P. 121 – 125.
180. Pereyre S., Gonzalez P., Barbeyrac B. de, Darnige A., Renaudin H., Charron A., Raherison S., Be'be'ar C., Be'be'ar C.M. Mutations in 23S rRNA Account for Intrinsic Resistance to Macrolides in *Mycoplasma hominis* and *Mycoplasma fermentans* and for Acquired Resistance to Macrolides in *M. hominis* // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2002. - Vol. 46. – N. 10. – P. 3142 - 3150.
181. Pereyre S., Renaudin H., Be'be'ar C., Be'be'ar C.M. In Vitro Activities of the Newer Quinolones Garenoxacin, Gatifloxacin, and Gemifloxacin against Human Mycoplasmas // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2004. - Vol. 48. – N. 8. – P. 3165 - 3168.
182. Pereyre S., Sirand-Pugnet P., Beven L., Charron A., Renaudin H., Barre' A. [et al.] Life on Arginine for Mycoplasma hominis: Clues from Its Minimal Genome and Comparison with Other Human Urogenital Mycoplasmas // PLoS Genet. – 2009. - Vol. 5. – N. 10. e1000677. doi:10.1371/journal.pgen.1000677.
183. Raherison S., Gonzalez P., Renaudin H., Charron A., Be'be'ar C., Be'be'ar C.M. Evidence of Active Efflux in Resistance to Ciprofloxacin and to Ethidium Bromide by *Mycoplasma hominis* // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2002. Vol. 46. – N. 3. – P. 672 - 679.
184. Raherison S., Gonzalez P., Renaudin H., Charron A., Be'be'ar C., Be'be'ar C.M. Increased Expression of Two Multidrug Transporter-Like Genes Is Associated with Ethidium Bromide and Ciprofloxacin Resistance in *Mycoplasma hominis* // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2005. Vol. 49. – N. 1. – P. 421 - 429.

185. Razin S., Maniloff J., McElhaney R.N. [et al.] *Mycoplasma* taxonomy and ecology // *Mycoplasmas: molecular biology and pathogenesis*, Washington, D.C: AmerSocMicrobio. – 1992. P. 3 - 22.
186. Redelinghuys M.J., Ehlers M.M., Dreyer A.W., Lombaard H.A., Kock M.M. Antimicrobial susceptibility patterns of *Ureaplasma* species and *Mycoplasma hominis* in pregnant women // *BMC Infectious Diseases*. – 2014. – N. 14. – P. 171 -177.
187. Redelinghuys M.J., Ehlers M.M., Dreyer A.W., Lombaard H.A., Kock M.M. Comparison of the new Mycofast Revolution assay with a molecular assay for the detection of genital mycoplasmas from clinical specimens // *BMC Infectious Diseases*. – 2013. – Vol. 13. – 453 s.
188. Saitou N., Nei M. The neighbor-joining method: A new method for reconstructing phylogenetic trees // *Mol. Biol. Evol.* – 1987. – N. 4. – P. 406–425.
189. Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors // *PNAS*. - 1977. - Vol. 74. – N. 12. - P. 5463–5467.
190. Schneider S.C., Tinguely R., Droz S., Hilty M., Dona V., Bodmer T., Endimiania A. Antibiotic Susceptibility and Sequence Type Distribution of *Ureaplasma* Species Isolated from Genital Samples in Switzerland // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. – 2015. -Vol.59. – N. 10. – P. 6026 – 6031.
191. Shimada Y., Deguchia T., Nakanea K., Masuea T., Yasudaa M., Yokoia S. [et al.] Emergence of clinical strains of *Mycoplasma genitalium* harbouring alterations in ParC associated with fluoroquinolone resistance // *International Journal of Antimicrobial Agents*. – 2010. – N. 36. – P. 255 – 258.
192. Shipitsyna E., Savicheva A., Golparian D., Lagos A.C., Unemo M., Rumyantseva T., Khayrullina G., Guschin A., Edelstein I. [et al.] Prevalence of macrolide and fluoroquinolone resistance-mediating mutations in *Mycoplasma genitalium* in five cities in Russia and Estonia // *J. PLOS ONE*. – 2017. – Vol. 12. - N. 4. doi: 10.1371/journal.pone.0175763.
193. Skiljevic D., Mirkov D., Vukicevic J. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Mycoplasma hominis* and *Ureaplasma urealyticum* in genital

- samples collected over 6 years at a Serbian university hospital // Indian Journal of Dermatology, Venerology and Leprology. – 2016. – Vol.82. – N. 1. – P. 37 – 41.
194. Su H., Hutchison C.A., Giddings M.C. Mapping phosphoproteins in *Mycoplasma genitalium* and *Mycoplasma pneumoniae* // BMC Microbiol. – 2007. – N. 7. – 63s.
195. Sun J., Deng Z., Yan A. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2014. – N. 453. – P. 254– 267.
196. Tagg K.A., Jeoffreys N.J., Couldwell D.L., Donald J.A., Gilbert G.L. Fluoroquinolone and Macrolide Resistance-Associated Mutations in *Mycoplasma genitalium* // Journal of Clinical Microbiology. – 2013. - Vol. 51. - N. 7. – P. 2245 – 2249.
197. Tait-Kamradt A., Davies T., Cronan M., Jacobs M.R., Appelbaum P.C., Sutcliffe J. Mutations in 23S rRNA and Ribosomal Protein L4 Account for Resistance in Pneumococcal Strains Selected In Vitro by Macrolide Passage // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2000. -Vol. 44. – N. 8. – P. 2118 – 2125.
198. Taylor-Robinson D. The history and role of *Mycoplasma genitalium* in sexually transmitted diseases // Genitourin Med. – 1995. – N. 71. - P. 1 - 8.
199. Taylor-Robinson D. Infections Due to Species of *Mycoplasma* and *Ureaplasma*: An Update // <http://cid.oxfordjournals.org/> - 2014. – N. 18. – P. 671 – 684.
200. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice // Nucleic Acids Res. - 1994. - V.22. - P. 4673–4680.
201. Ueno P.M., Timenetsky J., Centonze V.E. [et al.] Interaction of *Mycoplasma genitalium* with host cells: evidence for nuclear localization // Microbiol. – 2008. – N. 154. - P. 3033 - 3041.

202. Van der Schalk T.E., Braam J.F., Kusters J.G.. Molecular basis of antimicrobial resistance in *Mycoplasma genitalium* // International Journal of Antimicrobial Agents. – 2020. - V. 55. – N. 4. – P. 105911. doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2020.105911.
203. Vester B., Douthwaite S. Domain V of 23S rRNA Contains All the Structural Elements Necessary for Recognition by the ErmE Methyltransferase // Journal of Bacteriology. – 1994. – Vol.176. – N. 22. – P. 6999 - 7004.
204. Voelkerding K.V., Dames S.A., Durtschi J.D. Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics // Clin. Chem. - 2009. -Vol. 55. – N. 4. - P. 641-658.
205. Waites K.B., Crabb D.M., Duffy L.B. Comparative In Vitro Activities of the Investigational Fluoroquinolone DC-159a and Other Antimicrobial Agents against Human Mycoplasmas and Ureaplasmas // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2008. - Vol. 52. – N. 10. – P. 3776 – 3778.
206. Waites K.B., Schelonka R.L., Xiao L. [et al.] Congenital and opportunistic infections: Ureaplasma species and Mycoplasma hominis // Semin Fetal Neonatal Med. – 2009. – Vol.14. – N. 3. – P.190 - 199.
207. Waites K.B., Crabb D.M., Liu Y., Duffy L.B. *In Vitro* Activities of Omadacycline (PTK 0796) and Other Antimicrobial Agents against Human Mycoplasmas and Ureaplasmas // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2016. -Vol. 60. – N. 12. – P.7502 – 7504.
208. Waites K.B., Crabb D.M., Xiao L., Duffy L.B. *In Vitro* Activities of Gepotidacin (GSK2140944) and Other Antimicrobial Agents against Human Mycoplasmas and Ureaplasmas // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 2017. - Vol. 61. – N. 10. – e01064-17. <https://doi.org/10.1128/AAC.01064-17>.
209. Waites K.B., Crabb D.M., Ratliff A.E. et al. Latest Advances in Laboratory Detection of *Mycoplasma genitalium* // J. Clin. Microbiol. – 2023. – V. 61. – N.3. – doi: 10.1128/jcm.00790-21
210. William A.A., Siddiqui D., Lovrich S.D., Callister S.M., Borgert A.J., Merkitch K.W. [et. al.] Bailey Epidemiologic Factors and Urogenital Infections

- Associated With Preterm Birth in a Midwestern U.S. Population // J. Obstet Gynecol. – 2014. – Vol.124. – N. 5. - P. 969 -977.
211. Woese C.R. Bacterial evolution // Microbiol Rev. - 1987. - Vol. 51. - N. 2. - P. 221-271. doi: 10.1128/mr.51.2.221-271.1987.
212. Wu H.N., Nakura Y., Motooka D., Nakamura S., Nishiumi F., Ishino S. [et al.] Complete Genome Sequence of *Ureaplasma parvum* Serovar 3 Strain SV3F4, Isolated in Japan // Genome Announcements. – 2014. – Vol. 2. – N. 3. – e00256-14.
213. Xiao L., Crabb D.M., Duffy L.B., Paralanov V., Glass J.I., Hamilos D.L., Waites K.B. Mutations in ribosomal proteins and ribosomal RNA confer macrolide resistance in human *Ureaplasma* spp. // J. Antimicrob Agents. – 2011. – Vol. 37. – N. 4. – P.377 – 379.
214. Yoshida H., Bogaki M., Nakamura M. Quinolone resistance determining region in the DNA gyrase *gyrA* gene of *Escherichia coli* // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1990. Vol.34. – N. 6. – P. 271 – 1272.
215. Yoshida H., Bogaki M., Nakamura M., Yamanaka L.M., Nakamura S. Quinolone resistance determining region in the DNA gyrase *gyrB* gene of *Escherichia coli* // Antimicrobial Agents and Chemotherapy. – 1991. -Vol.35. – N. 8. – P.1647 – 1650.
216. Zeinab A.A., Mutasim E.I., Naser E.B., Mohamed E.H. Vaginal infections among pregnant women at Omdurman Maternity Hospital in Khartoum, Sudan // J. Infect Dev Ctries. – 2014. - Vol. 8. – N. 4. – P. 490 - 497.
217. Zeng X.Y., Xin N., Tong X.N., Wang J.Y., Liu Z.W. Prevalence and antibiotic susceptibility of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in Xi'an, China // Eur J ClinMicrobiol Infect Dis. - 2016. - Vol.8. - P. 3 – 7.
218. Zeng T., Wu Y., Yang Z., Luo M., Xu C., Liu Z., Ouyang J., Liu L., Zhang X. Clinical and Microbiological Characterization of Bloodstream Infections Caused by *Mycoplasma hominis*: An Overlooked Pathogen // Infect Dis Ther. - 2022. - Vol. 11. - N. 3. - P.1003-1017. doi: 10.1007/s40121-022-00616-w

219. Zhang J., Chiodini R., Badr A. [et al.]The impact of next-generation sequencing on genomics // J. Genet. Genomics. - 2011. - Vol. 38. – N. 3. - P. 95–109.
209. Zhang R., Lin Y. DEG 5.0, a database of essential genes in both prokaryotes and eukaryotes // Nucl Acid Res. – 2009. – N. 37. – P. 455 – 458.
220. Zhang S., Wear D.J., Lo S. Mycoplasmal infections alter gene expression in cultured human prostatic and cervical epithelial cells // FEMS Immunol. Med. Microbiol. – 2000. - V. 27. – N.1 P. 43–50. doi: 10.1111/j.1574-695X.2000.tb01410.x. PMID: 10617789.
221. Zhu X., LI M., Cao H., Yang X., Zhang C.Epidemiology of *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis* in the semen of male outpatients with reproductive disorders // Experimental And Therapeutic Medicine. – 2016. – N. 12. – P. 1165 – 1170.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОБОЗНАЧЕНИЙ

- АБП - антибактериальные препараты
- АВС –ATP-binding cassette superfamily, эффлюксная система
- ВОЗ –всемирная организация здравоохранения
- ВЗОМТ – воспалительные заболевания органов малого таза
- ДНК – дезоксирибонуклеиновая кислота
- ИППП – инфекции, передаваемые половым путем
- КОЕ - колониеобразующая единица
- МПК - минимальная подавляющая концентрация
- МКБ-Х – Международная классификация болезней и причин смерти 10 пересмотра
- ПЦР – полимеразная цепная реакция
- ПЦР-РВ - полимеразная цепная реакция в режиме реального времени
- рРНК -рибосомальная рибонуклеиновая кислота
- тРНК – транспортная рибосомальная кислота
- УГТ – урогенитальный тракт
- ФХ – фторхинолоны
- 23S рРНК – большая субъединица рибосомальной рибонуклеиновой кислоты
- NGS - Next Generations Sequencing, секвенирование нового поколения
- BLAST – Basic Local Alignment Search Tool
- PGAP – Prokaryotic Genome Annotation Pipeline
- RAST – Rapid Annotation Subsystem Technology
- CARD – Comprehensive Antibiotic Resistance Database
- MFS – major facilitator superfamily, суперсемейство главных посредников
- MLST – multilocus sequence typing, мультилокусное сиквенс-типирование
- NCBI – National Center for Biotechnology Information
- IS – инсерционный элемент
- IL - интерлейкин
- TN - транспозон
- ORF - открытая рамка считывания

TLR – толл подобные рецепторы

TTRs – тринуклеотидные tandemные повторы

vaa (variable adherence-associated) – гены, кодирующие поверхностные белки *M.hominis*

mba (multiple-banded antigen) – гены, кодирующие поверхностные белки *Ureaplasma spp.*

mgpB, *mgpC* - гены, кодирующие поверхностные белки *M. genitalium*

msrA, *msrB*, *msrD* - (meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*) гены, ответственные за метициллин-резистентность

ermB – (erythromycin ribosome methylation) ген, кодирующий фермент метилазу

MDR – Multiple Drug Resistance, множественная лекарственная устойчивость

LNA – Locked Nucleic Acid, «закрытая» нуклеиновая кислота, представитель класса бициклических аналогов ДНК

MATE - Multidrug and toxic compound extrusion family, семейство эффлюксных белков

QRDR –Quinolone Resistance-Determining Region, регион, детерминирующий резистентность к фторхинолонам

CIP – ципрофлоксацин

OFL – офлоксацин

ERM – эритромицин

AZT – азитромицин

DOC - доксициклин

Структурный анализ генома штаммов *M. hominis*. Основная статистическая информация
о сборках и аннотации геномов десяти штаммов *M. hominis*

Характеристика	<i>M. hominis</i>									
	MH45	MH57	MH529	MH621	MH1002	MH1019	MH1817	MH1861	MH1866	MH1991
Количество прочтений, млн.	3,8	2,6	0,9	0,9	1,2	0,6	0,5	1,1	0,6	0,6
N50, тыс	33,5	42	23,7	47,5	35,2	32,5	36,7	18,6	54	25,2
Число контигов	36	39	126	63	80	74	67	133	74	80
Длина сборки, тыс.п.о.	643,1	636,5	634,07	641,7	642,2	637,6	639,7	643,5	640,9	646,2
Кодирующие последовательности	549	543	537	549	538	552	542	537	546	558
Уникальных CDS	14	4	8	4	5	5	4	10	4	5
tPHK	33	33	33	32	32	32	32	32	32	32
pPHK	6	6	6	6	6	6	6	6	6	6
GC-состав, %	27,1	27,2	27,2	27,1	27,1	27,2	27,1	27,2	27,1	27,2

Структурный анализ генома штаммов *Ureaplasma spp.* Основная статистическая информация о сборках и аннотации геномов четырех изолятов *U. urealyticum* и двух *U. parvum*

Характеристика	<i>U. urealyticum</i>				<i>U. parvum</i>	
	УУ445	УУ1000	УУ1000a	УУ1051	УП445a	УП1051a
Номер GenBank	QZWO000000000	QOKT000000000	QRHJ000000000	QOKU000000000	QRHI000000000	QRHK000000000
Число контигов	1703	212	909	960	704	1542
N50, тыс	1,4	42	35,2	23,7	47,5	32,5
Общая длина сборки, тыс.п.о.	607,8	849,9	647,8	756,8	664,5	596.2
Кодирующие последовательности	382	655	451	560	507	379
Уникальных CDS	115	6	61	95	66	123
тРНК	30	36	30	28	30	28
рРНК	7	6	9	6	6	10
GC-состав, %	26	25,9	26,3	26,1	25,9	26,4

Аллельные варианты генов «домашнего хозяйства» и генов вирулентности российских изолятов *Mycoplasma hominis*, депонированные на портале PubMLST

Локус	Изоляты <i>Mycoplasma hominis</i>									
	M45	M57	MH529	MH621	MH1002	MH1019	MH1817	MH1861	MH1866	MH1991
MLST										
<i>uvrA</i>	15*	16*	18*	19*	22*	21*	23*	24*	18*	20*
<i>gyrB</i>	6*	7 *	7*	9*	10*	10*	10*	10*	8*	10*
<i>ftsY</i>	9*	1	1	10*	13*	12*	14*	7	3	11*
<i>tuf</i>	11	13	4	7	15*	7	7	13	14*	13
<i>gap</i>	14*	14*	14*	16*	14*	18*	7	19*	15*	17*
MVLST										
<i>p120</i> '	13	14	2	17*	20*	19*	18*	21*	16*	18*
<i>vaa</i>	8*	9*	11*	12*	15*	14*	16*	10*	10*	13*
<i>imp1</i>	19*	20*	23*	21	26*	25*	27*	28*	22*	24*
<i>imp3</i>	17*	15	19*	20*	22*	21*	23*	9	18*	5
<i>p60</i>	14*	13*	15*	16*	18*	17*	19*	2	2	17*

*Выделены аллели, которые впервые были присвоены российским изолятам. Жирным выделены аллели, которые были присвоены эталонному и тунисским штаммам микоплазм ранее

Сиквенс и пато-типы российских изолятов *Mycoplasma hominis*

Типы	Изоляты <i>Mycoplasma hominis</i>									
	M45	M57	MH529	MH621	MH1002	MH1019	MH1817	MH1861	MH1866	MH1991
ST	36	37	45	39	42	41	43	44	38	40
VT	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41
eMLST	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42