УДК 616-093 (579.6)

ДЕТЕКЦИЯ ГЕНОВ *QAC A/B* И *SMR*, АССОЦИИРОВАННЫХ С УСТОЙЧИВОСТЬЮ К ДЕЗИНФЕКТАНТАМ, У МИКРООРГАНИЗМОВ

Савчук Ю.В.

Белорусский государственный медицинский университет, г. Минск, Республика Беларусь

Ключевые слова: *MRSA, внутрибольничные инфекции (ВБИ), устойчивость к биоцидам, молекулярно-генетическое типирование УПМ.*

Введение. Детекция генетических детерминант устойчивости к дезинфектантам у микроорганизмов относится к числу актуальных проблем медицинской науки, что обусловлено ростом устойчивости микроорганизмов к биоцидам и затрудняет поддержание противомикробного режима в организациях здравоохранения. Все это диктует необходимость изучения механизмов формирования и распространения резистентности к биоцидам у микроорганизмов. Плазмиды относятся к факторам горизонтального переноса генов резистентности у микроорганизмов, в связи с чем разработка и внедрение методов детекции плазмидных ДНК для дальнейшего использования их в качестве эпидемиологического маркера для изучения процессов возникновения и распространения внутрибольничных инфекций в условиях клинического стационара является перспективным [1,2,3].

Цель исследования состояла в разработке методов плазмидного типирования условно патогенных микроорганизмов, проявляющих устойчивость к антибиотикам и дезинфектантам, а также методов выявления генетических детерминант устойчивости к дезинфектантам.

Материалы и методы.

В работе исследованы культуры устойчивых к метициллину стафилококков (n=32, *Staphylococcus aureus*) и грамотрицательных бактерий (*Enterobacteriaceae spp*, *Acinetobacter spp.*, *Pseudomonas aeruginosa*), проявляющих устойчивость к антисептикам и дезинфектантам. Культуры получены из ЦГЭ и ОЗ г. Минска.

Экстракцию пДНК проводили для 18–24-часовых культур бактерий методом щелочного лизиса и нейтрализации с последующими сорбцией на силиконе и десорбцией.

Идентификацию генов *qacA/B* и *smr*, ассоциированных с устойчивостью к дезинфектантам проводили с использованием ПЦР, размеры ампликонов верифицировали путем анализа электрофореграмм с использованием программного обеспечения GelCompar 1,0 (рис. 1, 2).

Проведен биоанализ с помощью MEGA 5.03 плазмидных генов *qacA/B*, *smr*, сиквенсы которых были получены из международного банка геномов NCBI GeneBank [4] (рис. 3, 4).

Дерево построено в масштабе с длинами делений, аналогичными эволюционным расстояниям, использу-

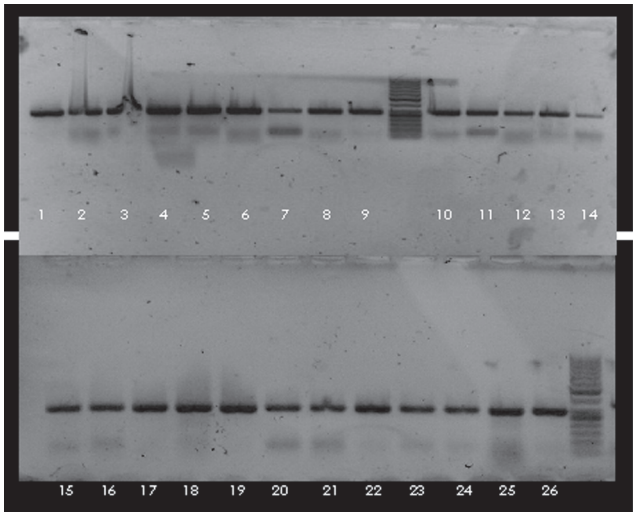

Рисунок 1 – Результаты амплификации гена smr у штаммов MRS 1173, 352, 179, 26500, 469, 134, 1041, 446, 27010, 261, 506, 392, 1175, 178, 1053, 173, 136, 1044, 263, 1048, 135, 387, 11798, 132, 1064 (ДНК-лестница 50 bp).

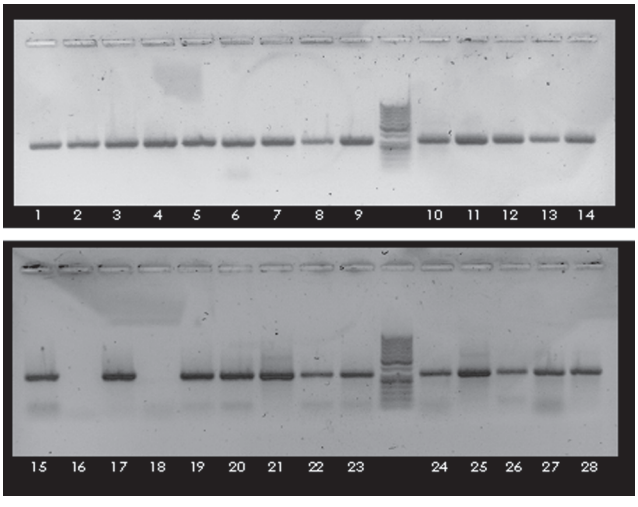

Рисунок 2 – Результаты амплификации гена qac A/B у штаммов MRS 135, 179, 263, 1173, 180, 220, 134, 392, 366, 1044, 423, 26500, 1041, 3180, 183, 261, 336, 364, 138, 429, 459, 300, 469, 440, 1031, 1036, 1099,1132, 2870, 27010, 1046, 387 (ДНК-лестница 50 bp).

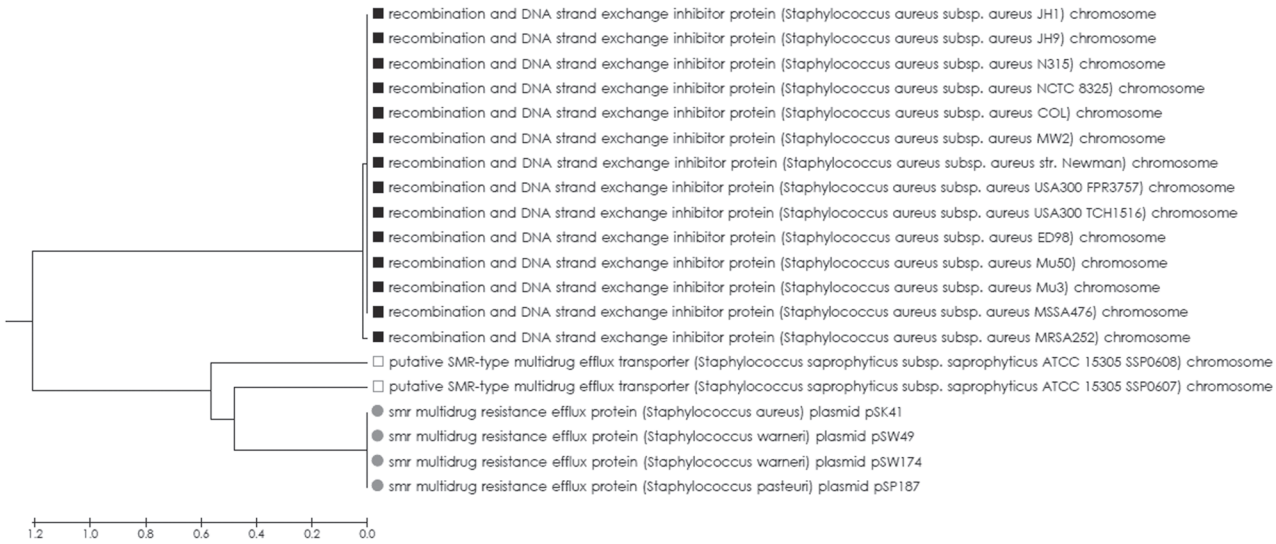

Рисунок 3 – Дендрограмма. Ген smr.[1]

[1] показано оптимальное дерево с суммой делений = 3.47796876 (анализ с участием 20 нуклеотидных последовательностей; все позиции, содержащие пробелы и отсутствующие данные, были устранены) [5,6]

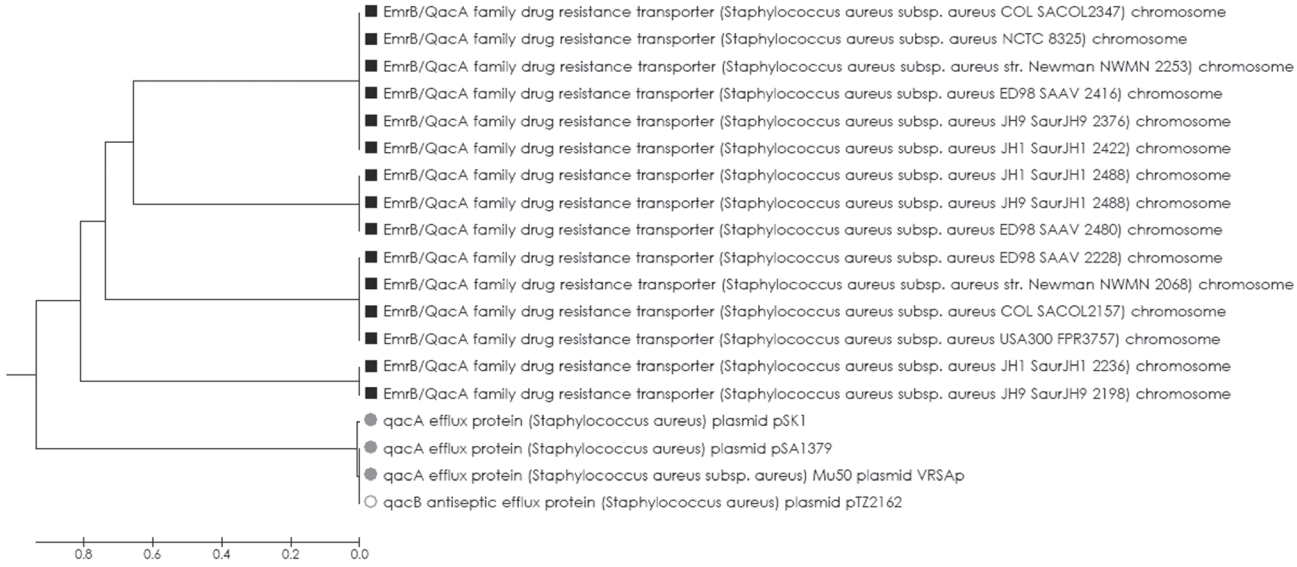

Рисунок 5 – Дендрограмма. Гены qacA/B.[2]

[2] показано оптимальное дерево с суммой делений = 4.08025983 (анализ с участием 19 нуклеотидных последовательностей; все позиции, содержащие пробелы и отсутствующие данные, были устранены) [5,6]

емым для построения филогенетического дерева. Эволюционные расстояния были рассчитаны с использованием Maximum Composite Likelihood method. Эволюционный анализ был проведен с использованием метода UPGMA.

Результаты и обсуждение.

Использованный метод экстракции плазмид позволяет выявлять плазмиды грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов. В процессе амплификации *qac A/B* и *smr* генов образуются ампликоны размером по 350 п.о. Было установлено, что среди исследованных культур грамположительных (n=32) микроорганизмов вида *S. aureus* ген *smr* выявлен у 94% штаммов (n=30), ген *qacA/B* выявлен у 75% штаммов (n=24).

Наблюдается более высокая частота встречаемости генов *qacA/B* и *smr* у резистентных к метициллину стафилококков (по сравнению с неустойчивыми по отношению к метициллину штаммами), обуславливающая высокие адаптационные возможности этих биовариантов к внутрибольничным условиям и проводимым в них противомикробным мероприятиям.

Проведенный биоанализ сиквенсов плазмидных *qacA/B*, *smr* генов подтверждает существование четких генетических групп, что свидетельствует о независимом приобретении этого гена несколькими изолированными штаммами-предшественниками.

Выводы.

В рамках проведенной работы: 1) разработан метод экстракции плазмид у стафилококков и других микро-

организмов; 2) разработан метод ПЦР детекции плазмидных генов *qacA/B*, ассоциированных с устойчивостью к дезинфектантам, который позволяет по присутствию ампликонов размером 350 п.о. проводить детекцию *qacA/B* генетической детерминанты; 3) разработан метод ПЦР детекции плазмидных генов *smr*, ассоциированных с устойчивостью к дезинфектантам, который позволяет по присутствию ампликонов размером 350 п.о. проводить детекцию *smr* генетической детерминанты; 4) установлена частота встречаемости генов *qacA/B* и *smr* среди резистентных к метициллину стафилококков, показатели которой являются более высокими в сравнении с частотой встречаемости этих генов у нерезистентных к метициллину стафилококков; 5) изучен ход эволюции генов *qacA/B* и *smr*. Проведенный биоанализ сиквенсов плазмидных *qacA/B*, *smr* генов подтверждает существование четких генетических групп, что свидетельствует о независимом приобретении этого гена несколькими изолированными штаммами-предшественниками у MRS.

Рецензент: член-кор. НАМН України, д.м.н., професор Бардов В.Г.

ЛИТЕРАТУРА:

1 Zechini B. Inhibitors of Multidrug Resistant Efflux Systems in Bacteria [Text] / B. Zechini, I. Versace // Recent Patents on Anti-Infective Drug Discovery. – 2009. – Vol. 4. – P. 37-50.

2 Piddock L. J. V. The importance of efflux pumps in bacterial antibiotic resistance [Text] / M. A. Webber, L. J. V. Piddock // Journal of Antimicrobial Chemotherapy. – 2003. – Vol. 51. – P. 9–11.

3 Piddock Laura J. V. Multidrug-resistance efflux pumps – not just for resistance [Text] / L. J. V. Piddock // Nature reviews (Microbiology). – 2006. – Vol. 4. – P. 629-636.

4 Международный банк геномов NCBI GeneBank.

5 Tamura K. MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0 [Text] / K. Tamura, J. Dudley, M. Nei, S. Kumar // Molecular Biology and Evolution. – 2007. – Vol. 24 (8). – P. 1596-1599.

6 Tamura K. MEGA: A biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences [Text] / K. Tamura, S. Kumar, M. Nei, J. Dudley // Briefings in bioinformatics. – 2008. – Vol. 9. – P. 299-306.

DETECTION OF GENES *QAC A/B* AND *SMR*, ASSOCIATED WITH RESISTANCE TO DISINFECTANTS

Julia V. Savchuk

Belarusian State Medical University, Minsk, Belarus

Summary. Resistance of bacterial cages to a wide range of antibiotics and chemotherapeutic agents in 50-80% of cases is caused by the R-plasmids, capable to bear stability simultaneously to 20 antibiotics. Working out and introduction of genetic methods of indication resistance to antibiotics, including caused by plasmids, is one of the most urgent problems modern theoretical and applied medicine. The research objective consisted in working out of methods of plasmids typing conditionally pathogenic microorganisms showing stability to antibiotics and disinfectants.

In work cultures of gram-positive bacteria (are received from CHE and PHD, Minsk), showing stability to disinfectants, are investigated. The bioanalysis of plasmids genes *qac A/B* and *smr* by means of MEGA 5.03 has been carried out.

Within the limits of the project: 1) the PCR method for detection of genes *qac A/B* and *smr*, associated with resistance to disinfectants, was developed; 2) a method for extraction of plasmids was developed.

Keywords: MRSA, IHI, biocides resistance, molecular-genetic typing.