

## ГЕНЕТИЧНІ АСПЕКТИ АНТИБІОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТІ ЗБУДНИКІВ ГНІЙНО-СЕПТИЧНИХ ЗАХВОРЮВАНЬ

М.Ю.Сиволап, П.М.Чуев, Ю.І.Бажора, В.Й.Кресюн

Одеський державний медичний університет

Ключові слова: ПЛР-детекція; антибіотикорезистентність; стафілококи

*Підкреслена актуальність проблеми гнійно-септичних захворювань. Незважаючи на значний арсенал засобів, летальність залишається досить високою. За допомогою ПЛР-детекції визначений і проаналізований сукупний геном, що характеризує антибіотикорезистентність золотистого та епідермального стафілококів до ряду препаратів. Отримані результати дозволяють дійти висновку, що резистентність до досліджуваних антибіотиків у золотистого та епідермального стафілококів носить полігенний характер. Сукупна генетична інформація щодо системи захисту від антибактеріальних засобів специфічна у кожного виду мікроорганізмів. Продемонстрована доцільність дослідження структури ДНК для розробки ефективних методів боротьби з патогенними мікроорганізмами.*

Проблема гнійно-септичних захворювань на теперішній час залишається однією з найактуальніших. Недивлячись на арсенал засобів, який постійно поповнюється, для їх лікування, летальність продовжує залишатися високою [4]. Особлива актуальність цієї проблеми відзначається у відділеннях інтенсивної терапії [1, 6]. Стратегічним компонентом у лікуванні гнійно-септичних захворювань є антибіотикотерапія, ефективність якої істотно залежить від фактора часу [3, 5].

В останні роки відзначається зниження ефективності антибактеріальної терапії, що пов'язано з підвищенням стійкості мікроорганізмів до цих лікарських засобів [9, 10]. Механізми, від яких залежить антибіотикорезистентність, різноманітні [2, 7]. У зв'язку з тим, що гени, які визначають стійкість мікроорганізмів до антибіотиків, можуть бути локалізовані як у геномній, так і в плазмідній ДНК, використання фармакогенетичних підходів вимагає ретельного аналізу [8]. Звичайно, визначається один із факторів, наприклад, гени аміноглікозидтрансферази за допомогою ПЛР-детекції [3].

Метою даної роботи є аналіз сукупного геному одних із найбільш частих збудників гнійно-септичних захворювань — золотистого та епідермального стафілококів у співставленні з антибіотикорезистентністю.

### Матеріали та методи

У роботі були використані 27 клінічних зразків золотистого стафілокока і 16 клінічних зразків епідермального стафілокока, у яких на основі антибіотикограм визначалася стійкість чи чутливість, що були виділені та ідентифіковані у клініко-мікробіологічній лабораторії Одеської обласної дитячої клінічної лікарні згідно з "Методичними рекомендаціями з мікробіологічної діагностики і профілактики стафілококових інфекцій" (МОЗ УРСР, Київ, 1979). Збір матеріалу проводили при надходженні хворого до стаціонару; використовувалися стандартні диференційно-діагностичні середовища для родової і видової ідентифікації — НПФ "Симеста-ВААЛ" (Одеса); для одержання антибіотикограм використовували метод дифузії антибіотиків із дисків в агарі, застосовуючи дис-

ки з антибіотиками фірми "Ranbaxy" (Індія) та НПФ "Симеста-ВААЛ" (Одеса); антибіотикорезистентність вираховували за загальноприйнятою шкалою: чутливий, помірно стійкий, стійкий відповідно до рекомендацій фірм-виробників; використовували маркери молекулярної ваги DNA ladder і pUC Mix; фланкуючі праймери до даних мікроорганізмів, які поставлялись відділом молекулярної діагностики і генної дактилоскопії Державного наукового центру Російської Федерації "ГОСНИИГЕНЕТИКА" (Москва).

Довільні праймери (P-53 5'-GTC TAA GTC G-3', P-54 5'-GTT AGG AGA C-3', P-64 5'-CCG GCA GCA AAA TG-3') були синтезовані на автоматичному ДНК-синтезаторі "Applied Biosystems 380B" ціанофосфорамітидним методом у Південному біотехнологічному центрі Української академії аграрних наук.

Полімеразну ланцюгову реакцію (ПЛР) виконували на ампліфікаторі "Терцик" (Росія). Температурний режим для двадцятичленних олігонуклеотидних праймерів був таким: початкова денатурація — 94°С, 4 хв.; один цикл із "м'яким" відпадом — 94°С, 3,5 хв., 65°С, 0,5 хв., 75°С, 0,5 хв.; наступні чотири цикли — 94°С,

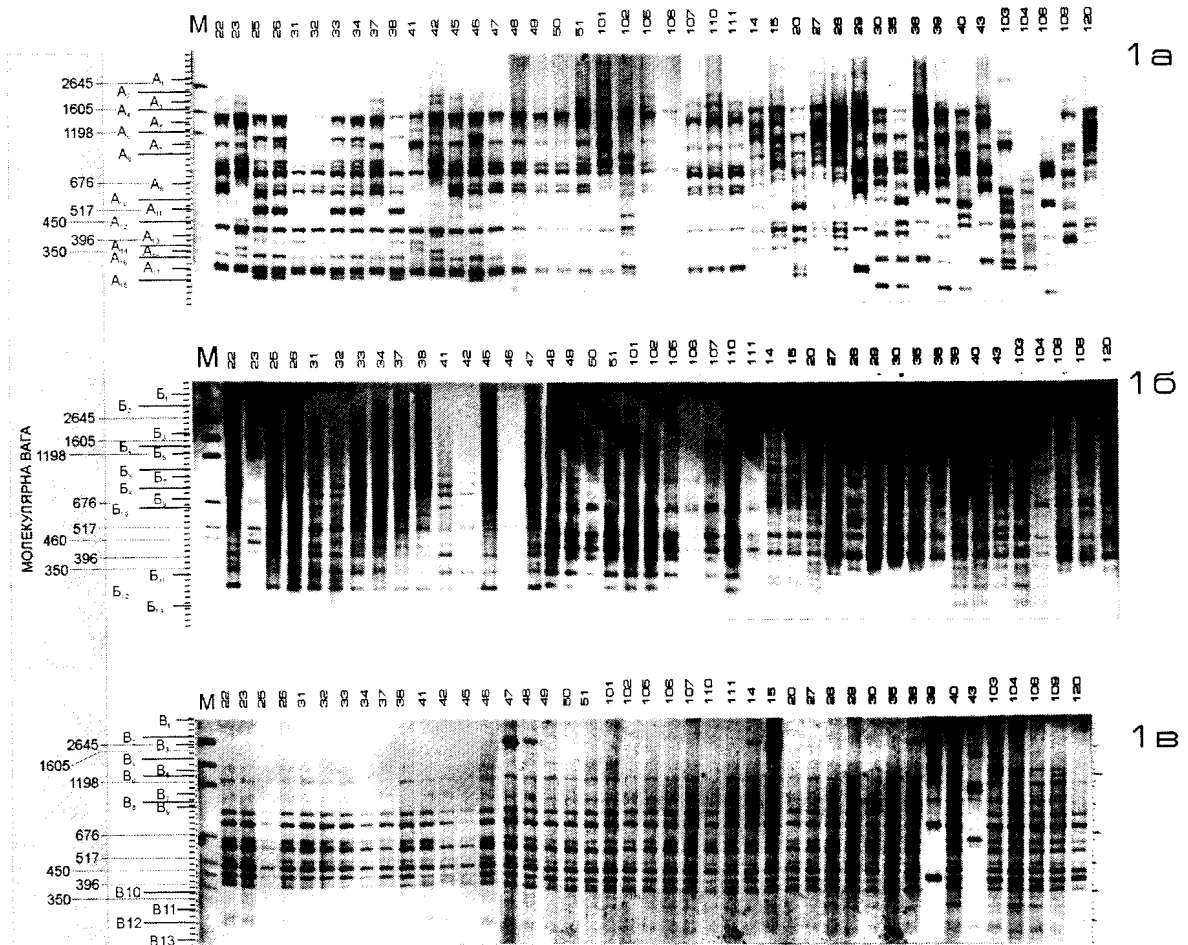


Рис. 1. Молекулярно-генетичний поліморфізм між зразками видів *Staphylococcus aureus* і *Staphylococcus epidermidis*, детектований за допомогою RAPD аналізу: 1а) з довільним праймером р64; 1б) з довільним праймером р53; 1в) з довільним праймером р54; М — маркер молекулярної ваги; По горизонталі — порядкові номери клінічних зразків.

1 хв., 42"З, 2 хв., 72"З, 2 хв.; потім 33 цикли — 94"З, 1 хв., 52"З, 1,6 хв., 72"З, 2 хв.; остання елонгація — 72"З, 6 хв. Для десятичленних праймерів: початкова денатурація — 94"З, 4 хв.; один цикл із "м'яким" відпалом — 93"З, 3,5 хв., 75"З, 0,5 хв., 75"З, 0,5 хв. Наступні чотири цикли — 93"З, 0,9 хв., 72"З, 2 хв., 39"З, 1,6 хв. Основні 33 цикли — 93"З, 0,9 хв., 72"З, 2 хв., 47"З, 1,6 хв.

Продукти ампліфікації фракціонували електрофорезом у 2%-ному агаровому гелі в 1х ТВЕ-буфері на апараті горизонтального електрофорезу (Hoefer Scientific Instruments, USA) при 100 V протягом п'яти годин, візуалізували бромистим етидієм і фотографували в УФ-світлі на фотоплівку "Мікрат 300".

Електрофоретичні профілі ампліфікованої ДНК кожного зразка вивчали візуально і кодували бінар-

но: наявність чи відсутність смуги відзначали "1" або "0" відповідно. На електрофореграми поліморфні амплікони позначали відповідно до довільних праймерів: р64 — А<sub>1</sub>, А<sub>2</sub> і т.п., р53 — В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub> і т.п., р54 — В<sub>1</sub>, В<sub>2</sub> і т.п. (рис. 1).

### Результати та їх обговорення

Отримані послідовності поліморфних смуг записані як генотип кожного з досліджених мікроорганізмів і співставлені з антибіограмами (табл.). Визначений ряд послідовностей ампліконів, характерний для антибіотикорезистентних мікроорганізмів (рис. 2).

Генотип, загальний для штамів золотистого стафілокока, резистентних до цифрану (ципрофлоксацину), — А<sub>5</sub>А<sub>10</sub>А<sub>16</sub>В<sub>7</sub>В<sub>8</sub>В<sub>9</sub>; для групи зразків епідермального стафілокока — А<sub>8</sub>В<sub>11</sub>В<sub>8</sub>. Генотип, загальний для штамів епідерма-

льного стафілокока, резистентних до офромаксу (цефтріаксону), — А<sub>5</sub>А<sub>6</sub>А<sub>8</sub>В<sub>10</sub>В<sub>4</sub>В<sub>12</sub>. Бактерії, резистентні до рефліну (цефазоліну) мають наступну послідовність ампліконів: А<sub>5</sub>А<sub>9</sub>А<sub>10</sub>А<sub>18</sub>В<sub>4</sub>. Амплікон В<sub>4</sub> зустрічається у епідермального стафілокока, резистентного до рефліну (цефазоліну) і офромаксу (цефтріаксону). Епідермальні стафілококи, резистентні до гентаміцину, мають наступний характерний генотип: А<sub>10</sub>А<sub>18</sub>В<sub>6</sub>В<sub>5</sub>. Послідовності ампліконів, характерні для резистентності до кламаксу (кларитроміцину) у золотистого стафілокока: А<sub>8</sub>А<sub>9</sub>А<sub>15</sub>А<sub>16</sub>, в епідермального стафілокока: А<sub>5</sub>А<sub>6</sub>А<sub>8</sub>А<sub>18</sub>В<sub>10</sub>В<sub>4</sub>В<sub>8</sub>. Амплікон, загальний у досліджених резистентних до кламаксу (кларитроміцину) мікроорганізмів, — А<sub>8</sub>. Генотип, що визначає резистентність штамів епідермального стафілокока до оксациліну: А<sub>3</sub>А<sub>11</sub>В<sub>7</sub>В<sub>11</sub>В<sub>12</sub>В<sub>6</sub>.



Таблиця

## Співвідношення генотипу досліджуваних зразків з антибіотикорезистентністю

Клін. зразки	Генотип клінічних зразків (послідовність ампліконів)											
		Ампіцилін	Оксацилін	Пенцилін	Тетрацилін	Еритромицин	Кларитромицин	Олевандоміцин	Гентаміцин	Офромекс		
22a	A3A4A7A8A9A10 A11 A12 A15 A17B2B3B5B11B5B6B9B12	-	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
45a	A2A3A4A7A8A9A11A16A17B7B8B10B11B8B9	+	-	-	+	+	+	+	+	+	0	0
47a	A2A4A7A8A9A15A17B4B5B7B8B10B12B3B4B6B7B9B10	-	+	-	+	+	+	+	+	+	0	0
37a	A3A4A7A8A9A10 A12 A15 A17B1B3B5B10B12B5B6B8B9B10B12	+	+	-	+	+	+	+	+	+	0	0
31a	A4A6A9A11A13A15A17B7B8B10B11B12B6B9B10B12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
32a	A4A6A9A11A13A15A17B7B8B10B11B12B3B6B9B10B12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
38a	A4A6A9A11A13A15A17A18B1B3B7B8B10B11B12B5B6B9B10B12	+	+	-	+	-	+	+	+	+	0	0
46a	A2A4A6A7A8A9A11A14A16A17A18B5B6B7B9B10B12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	0	0
41a	A1A4A6A7A8A9A10A13A14A15A16A17B7B8B9B10B11B12B6B7B9B10B12	+	+	-	+	+	+	-	-	-	0	0
42a	A2A3A4A5A6A7A8A10A13A15A16A17B5B7B8B10B11B8B9	-	+	-	+	+	+	+	+	+	0	0
23a	A2A3A4A5A6A7A8A9A10A12A15A16A17B5B7B9B5B6B9B12	+	+	+	+	+	+	+	-	+	0	0
48a	A2A4A9A11A16A17A18B6B7B9B10B11B12B3B6B7B9B10	-	+	-	+	+	+	+	+	-	0	0
50a	A2A3A4A6A8A9A11 A15 A18 A17A18 B1B2B7B8B9B10B11B12B4B6B8B9B10	+	+	-	+	+	+	+	-	+	0	0
49a	A2A3A4A8A9A11A15 A17A18B5B7B8B9B10B11B12B4B6B8B9B10	-	-	-	+	-	+	+	+	+	0	0
51a	A3A4A5A7A8A9A10 A17A18 A17A18B5B7B8B9B10B11B12B4B6B7B9B10	+	-	-	+	+	+	-	+	+	0	0
101a	A2A4A6A7A8A9A17 B1B2B5B7B10B11B12B13 B5B6B8B9B10	-	+	-	+	-	+	+	+	+	0	0
102a	A3A4A6A8A9A10 A12 A13 A15 A17B4B7B8B10B11 B12B5B8B7B10	+	+	-	+	-	+	+	+	+	0	0
105a	A2A3A4A6A8A9A11 A17B7B10B11B12B4B6 B7B9B10B11B12	+	-	-	+	-	+	+	+	+	0	0
107a	A2A4A6A7A8A9A10 A12 A17B7B8B10B11B12 B1B4B6B8B9B10B11B13	+	+	-	-	+	+	+	+	+	0	0
110a	A2A3A4A5A7A8A10 A12 A17B1B6B9B10B11B12 B4B6B9B10B11	-	+	-	+	+	+	+	+	-	0	0
106a	A4A6A17B8B10B5B6 B7B9B10B11B13	+	+	-	+	-	+	+	+	-	0	0
111a	A3A4A6A7A9A10 A12 A14 A18 A17B8B10B4B8B9 B10B11B13	+	+	-	+	-	+	+	+	-	0	0
29	A2A3A4A5A7A8A9A10 A11 A16A17A18B5B9B7 B9B10B11B1B4B6B9B10 B11B13	-	+	-	+	-	+	+	+	+	0	0
25a	A1A4A9A10 A11A13 A16 A17A18B2B5B7B8 B9B12B9	+	+	-	+	+	+	+	+	+	0	0
26a	A2A3A4A7A8A11A14 A16 A17A18B1B2B4B6 B10B12B4B6B9B10B12	+	+	-	+	+	+	+	+	+	0	0
33a	A4A7A9A11 A14A16 A17A18B4B5B9B10B11B12 B6B8B10B12	+	+	-	+	+	+	+	+	+	0	0
34a	A4A7A8A9A11A14 A16 A17A18B4B5B11B12B9B10	+	+	-	+	+	+	+	+	+	0	0
14e	A3A4A6A7A8A9 A11A12 A13 A14 A16 A17B4B5 B6B8B9B11B12B3B4B6 B9B10	0	-	-	+	+	+	+	+	0	+	+
15e	A4A6A7A8A9A12 A13 A15B5B6B7B9B11B12 B3B6B9B10	0	-	-	+	+	+	+	+	0	+	+
27e	A4A6A7A8A12 A13 A15B3B4B5B8B7B10B11 B4B6B8B9B10B11B12	0	-	-	+	-	+	-	+	0	+	-
28e	A1A3A6A7A8A9 A11A12 A13 A15 A17A18B3B4B6B7B9B10B11B5B8B9B10	0	-	-	+	+	+	+	+	0	+	+
20e	A3A4A6A7A8A9A10 A11A12 A13 A17A18B7B8B9 B10B11B13B4B6B9B10	0	-	-	+	+	+	+	+	0	+	+
30e	A3A4A6A8A9A10 A11A12 A13 A16 A18B5B6B7B8B9B10B4B6B9B10B11B12	0	-	-	-	+	+	+	+	0	+	-
35e	A4A6A7A8A9A10 A12 A13 A16 A18B5B10B3B9 B10B11B12	0	-	+	+	+	+	+	+	0	+	+
36e	A2A3A6A7A9 A12A17B3B4B5B8B9B10B3B6 B9B10B11B12	0	+	-	+	-	+	+	+	0	+	+
39e	A3A4A5A8A9A10 A11A12 A13 A16 A18B6B7B9B10B11B12B3B4B6B8B9	0	-	-	-	+	-	-	-	0	-	-
103e	A1A3A6A7A9A10 A11A12 A13 A14A16A17B2B5B6B7B9B10B11B12B3B4B5B6B8B9B10B11B12	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+
40e	A2A4A6A7A8A10 A11 A12 A13 A14 A16 A18B7B9 B10B11B12B3B4B5B6B8 B9B10B11B12B13	0	-	-	+	-	-	-	-	0	+	-
104e	A6A7A9 A10A11A12 A13 A14 A15 A17B7B10B11B2 B3B6B7B9B10B11B13	0	-	-	+	+	+	+	+	0	+	+
108e	A6A6A8A9A10 A13 A15 A17A18B6B8B10B11B4 B5B6B8B9B10B11B12B13	0	-	-	-	+	+	-	-	0	-	-
109e	A2A3A4A6A7A8A9 A10 A11A12 A13 A14A17A18B2 B3B5B7B10B5B6B9B9 B10B11B12	0	+	-	+	+	+	+	+	0	-	+
120e	A1A4A6A7A8A9 A12 A13 A15 A18B4B5B10B11 B2B6B8B9B10B11B12	0	-	-	+	+	+	-	+	0	+	+
43e	A2A3A5A7A9A11A12 A15 A16 B7B9B10B11B12B4 B5B6B7B8B12	0	+	+	+	+	+	+	+	0	+	+

Примітка: (-) — стійкі зразки; (+) — чутливі зразки; (0) — дослідження не проводилися; послі довність зазначена за порядком кластерного розподілу клінічних зразків за допомогою UPGMA відповідно до генетичних дистанцій, визначених dN<sub>xy</sub> — за Неєм та Лі.

Стойкість до ампіциліну характеризується наступною послідовністю: А<sub>2</sub>Б<sub>6</sub>Б<sub>10</sub>Б<sub>11</sub>. Загальний амплікон для зразків, стійких до ампіциліну та оксациліну, — В<sub>11</sub>.

#### ВИСНОВКИ

Отримані результати дозволяють дійти висновку, що резис-

тентність до досліджуваних антибіотиків у золотистого та епідермального стафілококів носить полігенний характер. Сукупна генетична інформація про системи захисту від антибактеріальних засобів, специфічна для кожного виду мікроорганізмів. От-

же, у практичній охороні здоров'я для розробки ефективних методів визначення антибіотикорезистентності доцільно досліджувати полігенну структуру стійкості до антибіотиків з використанням методів молекулярної генетики.

#### ЛІТЕРАТУРА

1. Агеев А.К., Балябин А.А., Шипилов В.М. //Клин. мед. — 1982. — №5. — С. 91-95.
2. Березняков И.Г. //Біль, знеболювання та інтенсивна терапія. — 1999. — №3(8). — С. 28-31.
3. Вакуленко С.Е., Энтина Е.Г. //Антибиотики и химиотерапия. — 1992. — Т. 36, №6. — С. 48-52.
4. Горшевицова Э.В. //Клин. антибиотикотерапия. — 1999. — №1(1). — С. 41-43.
5. Ерофеев В.В., Лирцман И.В., Поликарпова С.В. //Хирургия. — 1998. — №12. — С. 48-52.
6. Карабак В.И. //Антибиотики и химиотерапия. — 2000. — Т. 45, №3. — С. 20-23.
7. Сидоренко С.В., Резван С.П., Грудинина С.А. и др. //Антибиотики и химиотерапия. — 1998. — №6. — С. 15-25.
8. Шлапак И.П., Недашковский С.М., Исаенко Н.П. и др. //Біль, знеболювання та інтенсивна терапія. — 1999. — №3(8). — С. 10-17.
9. Barden L.S., Dowell S.F. //Clin. Pediatr. (Phila). — 1998. — №37(11). — P. 665-671.
11. Johnson A.P. //J. Hosp. Infect. — 1998. — №40 (1). — P. 17-26.

Адреса для листування: 65026, м. Одеса, пров. Валіховський, 2. Тел.(0482) 25-63-33. Одеський державний медичний університет

Надійшла до редакції 13.03.2001 р.

### Інформаційне повідомлення відділу фармакологічного нагляду Державного фармакологічного центру МОЗ України

Про побічну дію препарату **“Комбівент”** (аерозоль дозований, фл. по 10 мл) виробництва фірми “Boehringer Ingelheim France” (Франція)

У хворої 45 років на бронхіальну астму призначення в комплексній фармакотерапії (одночасно пацієнтка отримувала мукалтин, еуфілін) комбівенту (1 інгаляційна доза 2 рази на добу) призвело до посилення бронхоспазму. Препарат був відмінений. Додатково призначався гідрокортизон. Зазначені явища зникли без наслідків.

Алергологічний анамнез не обтяжений. Будь-які незвичайні реакції на ліки або хімічні речовини в минулому не відомі.

Інформація надійшла від Вінницького регіонального відділення ДФЦ МОЗ України.