

DETECTION GENES ENCODING BETA-LACTAMASES AND PATHOGENICITY FACTORS IN UROPATHOGENIC E. COLI

Mironchyk M.I.¹, Slizen V.V.² (Republic of Belarus)

Email: Mironchyk57@scientifictext.ru

¹Mironchyk Maryia Igorevna – Student,
MEDICAL FACULTY;

²Slizen Veronika Vjacheslavovna – PhD, Associate Professor,
DEPARTMENT OF MICROBIOLOGY, VIROLOGY, IMMUNOLOGY,
BELARUSIAN STATE MEDICAL UNIVERSITY,
MINSK, REPUBLIC OF BELARUS

Abstract: urinary tract infections is a serious social, medical and economic problem. They are one of the leading causes of declining quality of life, disability and premature mortality. The ability of *E. coli* to cause Urinary tract infections is associated with the action of not one factor of pathogenicity, but their simultaneous total influence. Due to the growth of resistance to antibiotics *E. coli* there is a need to study the genetic basis of the expansion of resistant forms. Frequency of genes encoding beta-lactamases in uropathogenic *E. coli* were under study. Correlation between antibiotic resistance profiles and beta-lactamases type produced by uropathogenic *E. coli* was investigated.

Keywords: urinary tract infections, β -lactamase, bla SHV, *E. coli*.

ДЕТЕКЦИЯ ГЕНОВ БЕТА-ЛАКТАМАЗ И ФАКТОРОВ ПАТОГЕННОСТИ УРОПАТОГЕННЫХ E. COLI

Мирончик М.И.¹, СлиZENь В.В.² (Республика Беларусь)

¹Мирончик Мария Игоревна – студент,
лечебный факультет;

²СлиZENь Вероника Вячеславовна – кандидат медицинских наук, доцент,
кафедра микробиологии, вирусологии, иммунологии,
Белорусский государственный медицинский университет,
г. Минск, Республика Беларусь

Аннотация: уроинфекции – серьезная социальная, медицинская и экономическая проблема. Они являются одной из ведущих причин снижения качества жизни, инвалидизации и преждевременной смертности. Способность *E. coli* вызывать уроинфекции связана с действием не одного фактора патогенности, а одновременного суммарного их влияния. В связи с ростом резистентности к антибиотикам *E. coli* возникает необходимость изучения генетических основ экспансии резистентных форм. В работе представлены данные по частоте встречаемости генов, кодирующих β -лактамазы *E. coli*, выделенных у пациентов с уроинфекциями.

Ключевые слова: уроинфекции, β -лактамазы, bla SHV, *E. coli*.

Актуальность. β -лактамазы представляют обширную группу генетически и функционально различных ферментов, отличающихся способностью разрушать β -лактамы антибиотиков, тем самым обеспечивая устойчивость к ним бактерий-продуцентов.

БЛРС (β -лактамазы расширенного спектра) не наделяют бактерии какими-то особыми факторами патогенности или вирулентности. Опасность инфицирования бактериями – продуцентами БЛРС обусловлена другими факторами, среди них:

- формирование резистентности ко всем пенициллинам и цефалоспорином, что ограничивает применение важнейших классов антибиотиков;
- наличие сопутствующей полирезистентности к другим классам антибиотиков (аминогликозидам, фторхинолонам и др.), которые применяются при тяжелых инфекциях;
- быстрое распространение БЛРС среди грамотрицательных бактерий, в том числе принадлежащих к другим родам;
- трудность выявления БЛРС общепринятыми микробиологическими методами;
- частая клиническая неэффективность лечения, так как «БЛРС-инфекции» гораздо труднее поддаются антибактериальной терапии, в связи с чем отмечается ухудшение течения инфекций, рост летальности по сравнению с инфекциями, вызванными возбудителями, не продуцирующими БЛРС;
- экономический ущерб, который связан с усложнением микробиологической диагностики, затратами на инфекционный контроль, необходимостью применять дорогостоящие антибиотики, клинической

неэффективностью и дополнительными расходами в связи с увеличением срока пребывания в стационаре [2, 5].

Цель: Определить гены некоторых бета-лактамаз уропатогенных *E.coli*.

Материал и методы. С помощью ПЦР исследованы культуры *E.coli* (n=80), выделенные от амбулаторных пациентов с ИМП и беременных с бактериурией на базе Центра гигиены и эпидемиологии г. Минска. Исследованные культуры *E.coli* были выделены от пациентов с ИМП – 23% (n=18); хроническим циститом – 8% (n=6); мочекаменной болезнью – 9% (n=7); хроническим пиелонефритом – 3% (n=3); рецидивирующими ИМВП – 1% (n=1); циститом – 6% (n=4); другими диагнозами – 9%; без диагноза – 13% (n=10), беременность – 27% (n=21), пиелонефрит у беременной женщины – 1% (n=1).

Для выделения ДНК использовали 16-20 часовые чистые культуры *E.coli*. Экстракцию бактериальной ДНК проводили методом термического лизиса (98 °С в течение 10 минут в 5% суспензии Chelex-100 в 1хТАЕ буфере) с последующим ультрацентрифугированием (15000 об/мин – 10 мин) для осаждения клеточного дебриса. Исследовали супернатант.

Детекцию продуктов амплификации проводили методом электрофореза в 1,0-2,0% агарозном геле с этидием бромидом (0,5 мкг/мл). Параметры электрофореза 200 В, 100 мА, 1 час.

Для выявления генов устойчивости к бета-лактамным антибиотикам использовали праймеры, приведенные в таблице 1.

Таблица 1. Идентифицируемые гены, размеры получаемых ампликонов, режимы амплификации, состав праймеров

Название олигонуклеотида	Состав праймеров 5' → 3'	Ампликоны, п.о.	Амплификация, режим
SHV-392-F	aggattgactgcctttttg	392	38X(95°C – 45с, 65°C – 50с, 72 °C – 1 мин)
SHV-392-R	atttgctgatttcgctcg		
310- ST131-F	gactgcatttcgctgccata	310	38X(95°C – 45с, 65°C – 50с, 72 °C – 1 мин)
310- ST131-R	ccggcgcatcataatgaaa		
OXA-619 F	atatctctactgttgcactctcc	619	38X(95°C – 45с, 66°C – 50с, 72°C – 1 мин)
OXA 619-R	aaacccttcaaacatcc		
PAN-CTX-M-F	tttgcgatgtgcagtaccagtaa	544	38X(95°C – 45с, 66 °C – 50с, 72°C – 1 мин)
PAN-CTX-M-R	cgatatcgttggtggtgccata		
827-IHA-F	ctggcggaggctctgagatca	827	25X(95°C – 1 мин, 68°C – 1 мин, 72 °C – 1 мин 20с), 16x(95°C – 1 мин, 64 °C – 1 мин, 72°C – 1 мин 20с)
827-IHA-R	tccttaagctcccgcggctga		
498-cnfl-F	aagatggagtctctatgcaggag	498	Аналогично
498-cnfl-R	cattcagagtctgcctcattatt		
16s rRNA F	geggacgggtgagtaatgt	202	Аналогично
16s rRNA R	tcatcctctcagaccagcta		
508FimH-F	tgcagaacggataagccgtgg	508	Аналогично
508FimH-R	gcagtcacctgcctccggta		
1000-usp –F	atgctactgttccggtagtg	1000	Аналогично
1000-usp-R	catcatgtagtcgggcgtaaaca		
310- ST131-F	gactgcatttcgctgccata	310	Аналогично
310- ST131-R	Ccggcgcatcataatgaaa		

Для постановки ПЦР готовили реакцию смесь, состав которой приведен в таблице 2.

Результаты и их обсуждение. Из 80 культур у 19 (23,8±4,8%) был выявлен ген blaSHV. Только 1 штамм *E.coli* с SHV генами в составе генома относился к резистентному клону ST 131, получившему эпидемическое распространение в мире. У некоторых штаммов были выявлены бета-лактамазы oxa и ctxM.

Таблица 2. Состав реакционной смеси для ПЦР

Реагент	Объем, мкл	Концентрация
Экстрагированная ДНК	10 (или 5)	-
10 x реакционный Taq буфер	5	1x
Праймер прямой	по 20 пкМ/реакцию	
Праймер обратный	по 20 пкМ/реакцию	
Раствор 10 x dNTP (200 мкМ каждый: dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	5	1x
MgCl ₂ (25 mM)	3	1,5 mM
ПЦР-энхансер 5xCES (2.7 M бетаин, 6.7 mM DTT, 6.7% ДМСО, 55 мкг/мл BSA)	5	
Taq полимеразы (5 ед/мкл)	0,25	1,25 ед
Свободная от нуклеазы деионизованная вода	Add 50 мкл	

Способность *E.coli* вызывать уроинфекции связана с действием не одного фактора патогенности, а одновременного суммарного их влияния. Для колонизации мочевыводящих путей и персистенции в них УПКП экспрессируют фимбрии, нефимбриальные адгезины, сидерофоры, экзотоксины. Вирулентность у УПКП может быть связана с гемолизином (ген *hlyA*), цитотоксическим некротизирующим фактором (*cnf*), автотранспортером (*sat*), Р-фимбриями (*pap*), фимбриями типа 1 (*fim*), иерсинобактином (*fyu*), терморезистентным гемагглютинином (*hga*), S-фимбриями (*sfa*), инвазином (*ibeA*), адгезином (*iha*), аэробактерином (*aer*), сидерофорами (*iucC*, *iutA*, *iroN*) и антигеном 43 (*ag43*), капсульным антигеном, адгезинам P, S, Dr. Комменсальные штаммы, как правило, данные факторы патогенности не образуют и их геномы не содержат гены, кодирующие данные факторы патогенности [4].

С использованием ПЦР была изучена частота встречаемости генов, ассоциированных с вирулентностью *E.coli* - *cnf1*, IHA, *fimH*, *usp*. В процессе амплификации генетических маркеров клона ST 131 в положительных случаях образовались ампликоны размером 310 п.о., гена *cnf1* – 498 п.о., гена IHA – 827 п.о., видоспецифичных для *E.coli* участков 16S рРНК – 202 п.о. и специфичных для уропатогенных *E.coli* *fimH* генов – 508 п.о. Важной детерминантой вирулентности УПКП является протеин уропатогенности, кодируемый геном *usp*, в процессе определения которого в ПЦР образовывались фрагменты размером 1000 п.о. Согласно полученным данным, частота встречаемости генов *cnf1* и IHA составила 35 и 30% соответственно. Как правило, эти гены редко встречались совместно у одного штамма (5% культур), у культур *E.coli* преимущественно встречался один из этих генов. Большинство изученных культур *E.coli* содержали *fimH* ген (97,1%), что свидетельствует об их принадлежности к уропатогенным патогенам. Большинство штаммов содержали и ген *usp* (82%), ассоциированный с уропатогенностью. Один штамм не содержал *fimH* ген и *usp*, но у него амплифицировались видоспецифические структуры 16SpРНК генов. Таким образом, у 82% изолятов *E.coli* амплифицировались все три гена – *fimH*, *usp*, 16SpРНК.

Выводы:

1. У уропатогенных *E. coli* были выявлены гены бета-лактамаз, кодирующие β-лактамазы - SHV (у 23,8% изолятов), а также *оха* и *стхМ*.
 2. Только 1 штамм *E.coli* с SHV генами в составе генома относился к резистентному клону ST 131, получившему эпидемическое распространение в мире.
- У уропатогенных *E. coli* частот выявления генов вирулентности составила: *cnf1* – 35%, *iha* – 30%, *fimH* – 97,1%, *usp* – 82%

Список литературы / References

1. Поздеев О.К., Гаянова А.Г., Сиразутдинова Л.М.[и др.]. Сравнительный анализ резистентности среди основных возбудителей уроинфекций / О.К. Поздеев, А.Г. Гаянова, Л.М. Сиразутдинова, Г.З. Шайгарданова, М.П. Шулаева // Практическая медицина, 2014. Том 7. № 83. С. 61-65.
2. Эйдельштейн М.В. β-лактамазы аэробных грамотрицательных бактерий: характеристика, основные принципы классификации, современные методы выявления и типирования / М.В. Эйдельштейн // Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2001. Том 3. № 3. С. 223-242.
3. Тапальский Д.В. Карбапенемазы грамотрицательных бактерий: распространение и методы детекции / Д.В. Тапальский, В.А. Осипов, С.В. Жаворонок // Медицинский журнал, 2012. № 2. С. 10-15.

4. *Жабченко И.А.* Уропатогенные штаммы *Escherichia Coli*: особенности функционирования, факторы вирулентности, значение в клинической практике / И.А. Жабченко // Таврический медико-биологический вестник, 2013. Т. 16. № 2 (2). С. 201-206.
5. *Страчунский Л.С.* β -лактамазы расширенного спектра – быстро растущая и плохо осознаваемая угроза / Л.С. Страчунский// Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия, 2005. Том 7. № 1. С. 92-96.