

© БАКШЕЕВА С.С.

УДК 575.191:616.211:614.87

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ МЕТОДА RAPD - ПЦР ДЛЯ
ГЕНОТИПИРОВАНИЯ ШТАММОВ *S. AUREUS*,
КОЛОНИЗИРУЮЩИХ СЛИЗИСТУЮ ОБОЛОЧКУ НОСА У ДЕТЕЙ,
НАХОДЯЩИХСЯ В УСЛОВИЯХ ТЕХНОГЕННОГО ПРЕССИНГА**

С.С. Бакшеева

Красноярский государственный медицинский университет им. проф.
В.Ф. Войно-Ясенецкого, ректор – д.м.н., проф. И.П. Артюхов; НИИ
эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, директор – академ.

РАМН А. Л. Гинцбург.

Резюме. В статье представлены результаты молекулярно-генетического типирования штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных со слизистой оболочки переднего отдела носа у детей, посетивших одну общеобразовательную школу. Показано, что большее количество геновариантов штаммов *S. aureus* (65%) имеют высокую степень сходства штаммов, что свидетельствует об их родственном происхождении.

Ключевые слова: *S. aureus*, молекулярно-генетические методы, дети.

Бакшеева Светлана Сергеевна – к.б.н., доцент кафедры микробиологии КрасГМУ; e-mail: dixi-1972@ya.ru.

Аветисян Лусине Ремуальдовна – к.м.н., старший научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи; e-mail: lusavr@mail.ru.

Чернуха Марина Юрьевна – д.м.н., ведущий научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций НИИ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи; e-mail: chernukha@gamaleya.org.

В последние годы в разных областях микробиологии и эпидемиологии широко используются молекулярно-генетические методы, которые в отличие от фенотипических методов исследования, основанных на выявлении фенотипических признаков, экспрессируемых генами микроорганизмов, представляют собой исследование структуры ДНК. Возможности методов, изучающих фенотипические признаки микроорганизмов (бактериологические, биохимические, серологические и др.), ограничены вследствие способности микроорганизмов изменять экспрессию соответствующих генов в ответ на влияние различных факторов окружающей среды. По сравнению с традиционными фенотипическими методами, молекулярно-генетические методы отличаются универсальностью, более глубоким уровнем дифференциации и высокой воспроизводимостью. Эти методы, благодаря своей высокой чувствительности и специфичности, в сочетании с традиционными методами, открывают новые возможности для исследования свойств, источников и путей передачи разных возбудителей [1,3,4]

Цель исследования: изучение генетического разнообразия штаммов *Staphylococcus aureus*, колонизирующих слизистую оболочку носа у детей, находящихся в условиях техногенного прессинга.

Материалы и методы

Изучено 20 штаммов *Staphylococcus aureus*, выделенных со слизистой оболочки переднего отдела носа у детей 7 -11 лет, посещавших одну общеобразовательную школу, расположенную в экологически неблагоприятном районе города Красноярска.

Выделение и идентификацию стафилококков проводили общепринятыми методами [2]. При определении видовой принадлежности штаммов использовали микротесты фирмы «Lachema» (Чехия).

Генотипирование штаммов золотистого стафилококка проводили с целью более точного субвидового типирования и определения степени генетического родства (выявление клональности) штаммов, выделенных от резидентных бактерионосителей – детей, проживающих в экологически неблагоприятном районе. Генотипирование проводили методом RAPD-ПЦР со случайным олигонуклеотидным праймером, размером 10 нуклеотидов Sh1 (Short 1) – ААТСГГГСТГ («Синтол»), имеющим хорошую разрешающую способность [5].

Построение дендрограммы проводили с помощью программного обеспечения TreeCon for Windows v.1.3. b на основе метода невзвешенного попарного арифметического среднего UPGMA (unweighted pair group method using arithmetic averages) с использованием коэффициента генетического различия между двумя кластерами вычисляется как среднее расстояние между всеми парами объектов в них [5].

Результаты и обсуждения

В результате типирования была получена электрофоретическая картина RAPD-ПЦР 20 штаммов *S. Aureus* (рис.1), на основе которых была построена дендрограмма (рис.2) с помощью программного обеспечения TreeCon. Установлено наличие 6 генотипов среди исследованных 20 штаммов *S.aureus*.

Общепринято, что если показатель степени генетического родства равно 0,8 и выше, то это характеризует высокую степень генотипического сходства исследуемой выборке штаммов, если 0,6-0,8 – умеренно; 0,4-0,6 – низкий; если сравниваемые штаммы имеют показатель ниже чем 0,4, то фактически они являются генотипически не родственными.

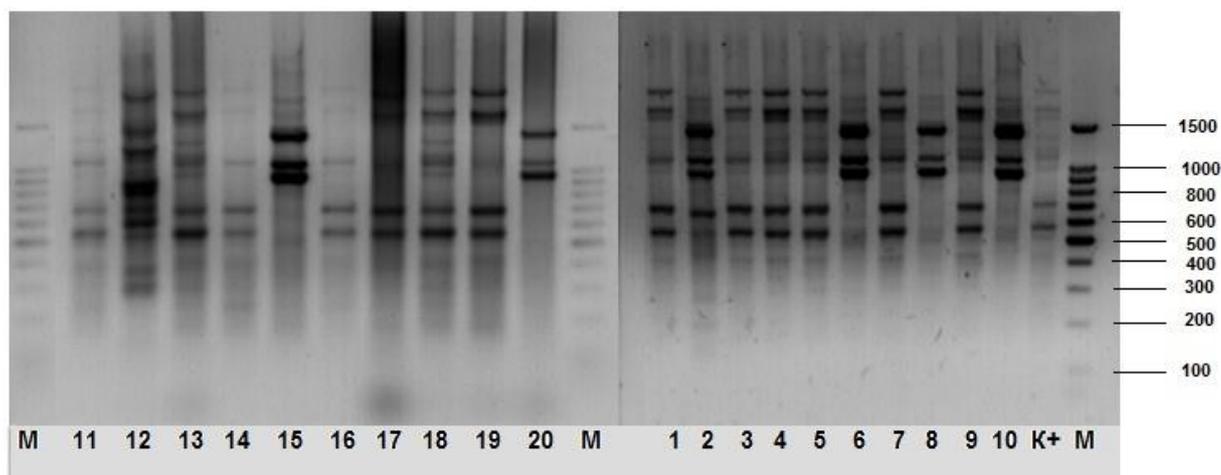


Рис. 1. RAPD-ПЦР штаммов *S. aureus*, выделенных от детей, проживающих в условиях техногенного прессинга.

В 1 генотип входили 8 штаммов под № 13,18,7,9,5,4,3,1 (индекс генетического сходства 1). В результате амплификации образовалось 9 ампликонов длиной от 300 до 1500 нп (нуклеатидные пары) и выше.

У штаммов, относящихся ко 2 генотипу (№ 16,17,19,11,14) при изучении электрофоретических профилей выявлены 6 ампликонов, длиной от 400 до 1500 нп и выше (гомология 100%).

В 6 генотип входили 4 изолята (№ 6,8,10,15), которые образовали по 6 ампликонов длиной от 500 до 1500 нп и выше.

Степень генетического родства у 1 и 2 генотипов составляет 85 % (то есть высокая степень генетического родства). У 3 генотипа степень генетического родства с 1 и 2 генотипами составляет 40 % (низкая степень родства).

Как видно из дендрограмм, большее количество геновариантов штаммов *S. aureus* (65%) имеют высокую степень сходства штаммов, что свидетельствует об их родственном происхождении. Это позволяет предположить, что источником распространения золотистого

стафилококка в данном детском коллективе являются один-два ребенка бактерионосителя. При этом имеет место воздушно-капельный путь передачи инфекции. Данная закономерность может быть использована в целях профилактики распространения воздушно-капельных инфекций в организованных детских коллективах (выявление и санация носителей).

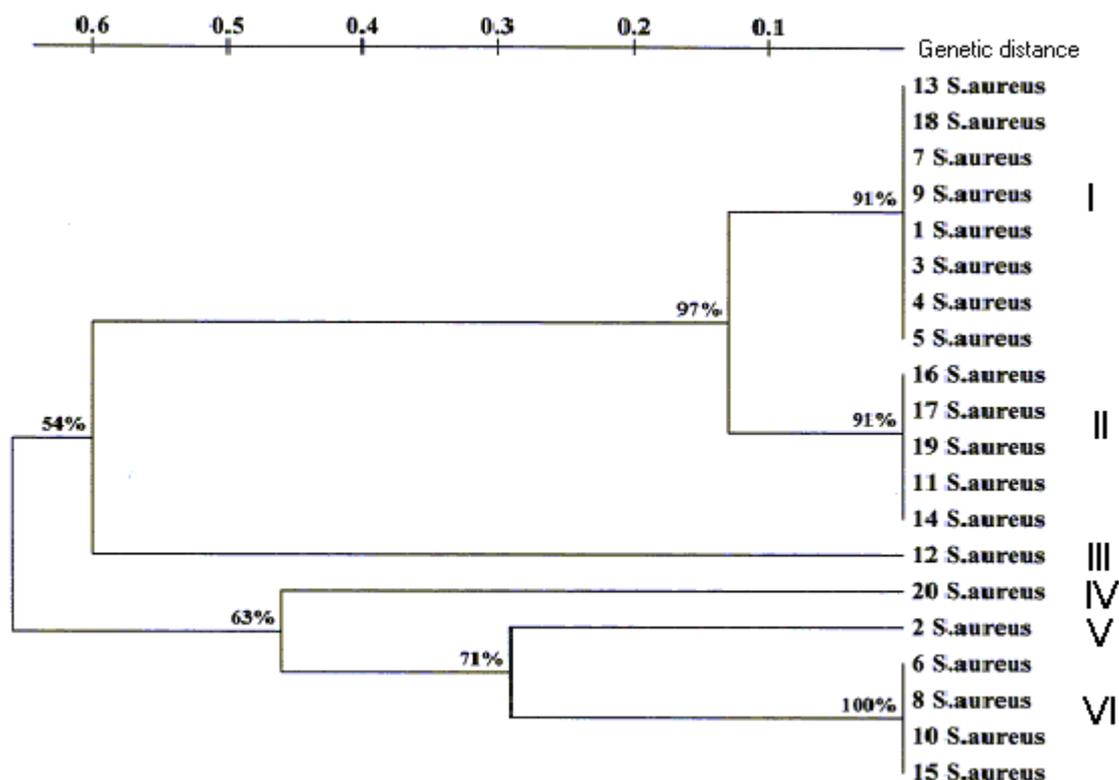


Рис. 2. Дендрограмма штаммов *S. aureus*.

Таким образом, молекулярно-генетические методы, основанные на амплификационной технологии (RAPD-ПЦР), позволяют эффективно решать задачи по молекулярно-генетическому типированию штаммов золотистого стафилококка, выделенных от резидентных бактерионосителей, с целью установления уровня их внутривидовых вариаций.

RAPD-PCR FOR GENOTYPING S.AUREUS, WHICH COLONIZING NASAL MUCOSA IN CHILDREN UNDER TECHNOGENIC LOAD

S.S. Baksheeva

Krasnoyarsk State Medical University named after prof. V.F. Voino-
Yasenetsky

Abstract. The paper presents molecular and genetic typing of *Staphylococcus aureus* form mucosa of frontal nasal cavity in children from single school. It was found out that the most strain's genotypes of *S. aureus* (65%) had a high similarity, giving evidence about their relative origin.

Key words: *S. aureus*, molecular and genetic methods, children

Литература

1. Аветисян Л.Р. Эпидемиологические и микробиологические аспекты колонизации кишечника детей первого года жизни условно-патогенными микроорганизмами: автореф. дис. ... канд. мед. наук. – М., 2008. – 22с.
2. Справочник по микробиологическим и вирусологическим методам исследования / Под ред. М.О. Биргера. – М., 1982. – С. 125-129.
3. Шагинян И.А., Тарасевич И.В. Молекулярная эпидемиология: предмет, цель и задачи новой науки // Матер. IX съезда Всероссийского научно-практического общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов. – М., 2007. – Т.-1. – С.41-42.
4. Шагинян И.А., Першина М.Ю. Генетические маркеры в эпидемиологии бактериальных инфекций //Журн. микробиол. – 1997. – № 4. – С. 54-59.

5. Lee W. Riley. Molecular epidemiology of infectious diseases. Principles and practices // ASM Press. – 2004. – № 5. – P. 106-112.