

GENETIC BASIS OF ANTIBIOTIC-RESISTANT BACTERIA

Gulshoda Orifjonova, Azamat Mo‘minov

Student of Kokand University, Andijan Branch

Lecturer at the Department of Microbiology, Pharmacology, Normal and Pathological Physiology, Kokand University, Andijan Branch

**Annotation:** This study investigated the genetic basis of antibiotic-resistant bacteria. The antibiotic susceptibility of *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, and *Klebsiella pneumoniae* strains isolated from clinical samples was determined, and the presence of resistance-related genes in their genomes was assessed using the polymerase chain reaction (PCR) method. The results revealed the widespread presence of resistance genes — *bla*<sub>TEM</sub>, *mecA*, *vanA*, and *aac(6’)-Ib* — among the bacterial strains. These findings are crucial for understanding the mechanisms of antibiotic resistance and improving strategies for the treatment of infectious diseases.

**Keywords:** antibiotic, resistance, resistance genes, PCR, bacteria.

**Kirish:** Antibiotiklar bakterial infeksiyalarni davolashda eng muhim vositalardan biri hisoblanadi. Biroq, so‘nggi yillarda ko‘plab bakterial shtammlar turli antibiotiklarga chidamli shakllarga aylangan. Bu holat tibbiyot amaliyotida katta muammolar keltirib chiqarmoqda. Antibiotikga chidamlilik, odatda, bakteriyalarning genetik o‘zgarishlari yoki boshqa bakteriyalardan chidamli genlarni olish orqali yuzaga keladi. Ushbu tadqiqotda klinik izolyatlardan ajratilgan bakteriyalarning antibiotiklarga chidamlilik darajasi va bu holatga sabab bo‘layotgan genetik omillar o‘rganildi.

#### Materiallar va metodlar

**1. Tadqiqot ob‘ekti.** Ushbu tadqiqotda klinik namunalar (siydik, balg‘am, qon)dan ajratib olingan bakterial shtammlar tahlil qilindi. Ajratilgan shtammlar orasida *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* va *Klebsiella pneumoniae* kabi tez-tez uchraydigan patogen bakteriyalar mavjud bo‘lib, ularning antibiotiklarga chidamlilik darajasi o‘rganildi. Nazorat sifatida antibiotiklarga sezgir shtammlar ishlatildi.

**2. O‘stirish muhiti va sharoitlari.** Bakteriyalar selektiv va differensial o‘stirish muhitlarida, jumladan Nutrient agar, MacConkey agar va Mueller-Hinton agar muhitlarida ekildi. Barcha namuna 37°C haroratda 24 soat davomida inkubatsiya qilindi.

Antibiotikga sezuvchanlikni aniqlash: Bakterial shtammlarning antibiotiklarga sezuvchanlik darajasi Kirby-Bauer disk diffuziya usuli yordamida baholandi.

**Kirbi-Bauer disk difuziya usuli.** Bakteriyaning ma‘lum antibiotiklarga qanday chidamlilik yoki sezgirlikda ekanligini aniqlash.

Usuli:

1. Bakteriya madaniyati yumshoq qattiq o‘simlik (agar) qatlamiga yoyiladi.
2. Madaniyat ustiga antibiotik impregnatsiyalangan kichik diskleri qo‘yiladi.
3. Petri idish yopilib, 24 soat davomida 37°C da inkubatsiya qilinadi.



Date: 17<sup>th</sup> June-2025

4. Inkubatsiyadan keyin, disklardan atrofda bakteriyalar o'smasligi (to'xtovsiz zonalar — inhibitsiya zonolari) o'lchanadi.

5. Inhibitsiya zonasi diametri ma'lum standartlarga solishtiriladi:

Katta zona — bakteriya sezgir (antibiotik ta'sir qilmoqda). Kichik yoki yo'q zona — bakteriya chidamli. Afzalliklari: Oson va tez. Turli antibiotiklarni bir vaqtda sinash imkoniyati Klinik laboratoriyalarda keng qo'llaniladi: Antibiotik chidamlilik bakteriyalarda genetik o'zgarishlar natijasida paydo bo'ladi. Kirbi-Bauer disk difuziya usuli bakteriyaning antibiotiklarga nisbatan chidamliligini aniqlash uchun oddiy va samarali laboratoriya usulidir. Testda ampicillin, tseftazidim, gentamitsin, siprofloksasin va vankomitsin kabi antibiotiklar qo'llanildi. Sezuvchanlik zonolari CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) tavsiyalariga asosan baholandi. CLSI haqida qisqacha CLSI — klinik laboratoriyalar uchun xalqaro standartlarni belgilovchi tashkilot. Ular antibiotiklar sezuvchanligini aniqlash uchun disk difuziya (Kirby-Bauer) testlari natijalarini baholashda standart o'lchov va talqin qoidalarini ishlab chiqadi.

**Sezuvchanlik zonalarini baholash usuli.**

Testdan keyingi qadamlar: Bakteriya Petri idishi ustiga yoyilib, antibiotik impregnatsiyalangan disklar joylashtiriladi.

Inkubatsiyadan keyin, disk atrofidagi bakteriyalar o'smasligi (to'xtovsiz zona) diametri millimetrda o'lchanadi.

Zona diametrini o'lchash. O'lchash diskning tashqi chetidan to to'xtovsiz zonaning tashqi chegarasigacha to'g'ri chiziq bo'ylab millimetrda amalga oshiriladi.

O'lchash uchun maxsus o'lchov qoidalari bor: Qalin o'lchov shkalasi yoki shaffof shkaladan foydalaniladi. Petri idishini tekis joyga qo'yib, ko'z darajasida o'lchash kerak.

CLSI tomonidan belgilangan baholash mezonlari

Sezuvchan (S) — antibiotik ta'sirli, bakteriya o'lishi yoki o'sishining to'xtatilishi ehtimoli yuqori.

Intermediat (I) — antibiotik ta'siri o'rtacha, ehtiyotkorlik bilan ishlatish kerak.

Chidamli (R) — antibiotik ta'sir qilmaydi, bakteriya o'sishini to'xtatmaydi.

Misol uchun, ba'zi antibiotiklar uchun zona diametrlarining talqini (CLSI 2024 yilda)

Antibiotik Sezuvchan (S) (mm) Intermediat (I) (mm) Chidamli (R) (mm)

Amoksitsillin  $\geq 18$   $15-17 \leq 14$

Siprofloksatsin  $\geq 21$   $16-20 \leq 15$

Eritromitsin  $\geq 23$   $14-22 \leq 13$

Eslatma: Har bir bakteriya va antibiotik uchun talqin mezonlari farq qilishi mumkin.

### 3. CLSI tasvirlarida baholash qoidalari

CLSI qo'llanmalarida har bir antibiotik uchun zona diametrining minimal sezuvchanlik, intermediat va chidamlilik chegaralari ko'rsatilgan.

Test natijalarini shu standartlarga solishtirish orqali antibiotikning samaradorligi baholanadi.

CLSI standartlari har yili yangilanib boradi, shuning uchun eng so'nggi versiyalariga amal qilish muhim[1].



Date: 17<sup>th</sup> June-2025

4. Amaliy ko'rsatma

1. Kirbi-Bauer testidan keyin zona diametrini aniq o'lchang.
2. CLSIning tegishli yildagi standart jadvalidan o'lchov qiymatini toping.
3. Zona diametriga mos keladigan S, I yoki R bahosini qo'ying.
4. Shifokorga natijani taqdim eting, u esa to'g'ri antibiotikni tanlaydi.
4. Genomik DNKni ajratib olish

Bakterial hujayralardan genomik DNK Qiagen DNK ajratish to'plami yordamida ajratib olindi. DNKning sifat va miqdori NanoDrop 2000 spektrofotometri yordamida baholandi. Shu bilan birga, DNKning yaxlitligi 1% agaroz gel elektroforezi orqali tasdiqlandi.

**5. Polimeraza zanjir reaksiyasi (PCR)** Bakteriyalarda antibiotiklarga chidamlilikka javobgar genlarni aniqlash maqsadida PCR usuli qo'llanildi. blaTEM, mecA, vanA, aac(6')-Ib kabi genlarga xos primerlar ishlatildi. PCR reaksiyasi quyidagi sharoitlarda olib borildi:

Denaturatsiya: 94°C, 30 soniya

Annealing: 55–60°C, 30 soniya

Elongatsiya: 72°C, 1 daqiqa

(Sikl soni: 35)

**6. PCR mahsulotlarini vizualizatsiya qilish**

Amplifikatsiyalangan PCR mahsulotlari 1.5% agaroz gelida elektroforez qilinib, DNK bantlari UV transilluminator yordamida kuzatildi. Mahsulotlar 100 bp DNK marker bilan solishtirilib baholandi. PCR mahsulotlarini vizualizatsiya qilish PCR nima?. PCR — maqsadli DNK bo'lagini ko'paytirish uchun ishlatiladigan molekulyar biologiya usuli.

Antibiotik chidamlilik genlarini aniqlashda PCR yordamida aynan kerakli genlarning mavjud yoki yo'qligi tekshiriladi. PCR mahsulotlarini vizualizatsiya qilish usullari PCR mahsulotlari (amplifikatlar) odatda quyidagi usullar bilan ko'rinarli qilinadi:

A) Agaroz gel elektroforezi

Eng keng tarqalgan usul. PCRdan keyin mahsulotlarni agaroz gelga solib, elektr tok yordamida DNK fragmentlarini hajmiga qarab ajratishadi.

DNK fragmentlari (PCR mahsulotlari) gel ichida harakat qiladi: kichik fragmentlar katta fragmentlarga qaraganda tezroq yuradi.

Gelga Etidium bromid (EtBr) yoki boshqa DNKga bog'lanadigan flüoresan bo'yoqlar qo'shiladi.

UV nurlar ostida gelda maqsadli DNK bo'lagi yorqin chiziq (bant) ko'rinishida ko'rinadi.

Mahsulot hajmi standart DNK molekulalar bilan solishtiriladi, bu orqali maqsadli gen aniqlanadi.

B) Qayta ishlash uchun boshqa bo'yoqlar

SYBR Green, GelRed, GelGreen kabi toksik bo'lmagan, yuqori sezgir flüoresan bo'yoqlar ham ishlatiladi.



Date: 17<sup>th</sup> June-2025

Ular UV yoki LED nurlarida yorqinlashadi va xavfsizroq hisoblanadi.

C) Qayta ishlash usullari (kamroq qo'llaniladi)

Southern blot — gel elektroforezdan keyin DNK ni membranga o'tkazib, maxsus zond yordamida maqsadli genni aniqlash.

Real-time PCR (qPCR) — PCR jarayonida to'g'ridan-to'g'ri gen miqdorini o'lchash (bu esa vizualizatsiya emas, lekin natijani ko'rishning zamonaviy usuli).

Jarayonning bosqichlari (agaroz gel elektroforezi misolida)

1. PCR amplifikatsiyasidan keyin mahsulotlar tayyorlanadi.
2. Agarozni eritib, quyib, to'qimalash uchun qotadi.
3. Mahsulotlar geldagi maxsus yoriqlarga (kuylarga) pipetka yordamida solinadi.
4. Elektr tok qo'yilib, DNK fragmentlari hajmiga ko'ra ajraladi.
5. Gel UV lampasi ostida ko'riladi va suratga olinadi.
6. PCR mahsulotining aniq hajmi standartlar bilan solishtiriladi.

PCR orqali antibiotik chidamlilik genlari mavjudligini aniqlash shifokorlarga to'g'ri antibiotik tanlashda yordam beradi.

Mahsulotlarni vizualizatsiya qilish — natijani aniq va ishonchli o'rganish imkonini beradi.

#### **7. Sekvenslash va bioinformatik tahlil (ixtiyoriy)**

Sekvenslash (DNK ketma-ketligini aniqlash)

*Sekvenslash maqsadi:* Antibiotik chidamlilik genlarini aniq identifikatsiya qilish Yangi yoki mutatsiyaga uchragan chidamlilik genlarini topish Bakteriya genetik materialining to'liq yoki qisman ketma-ketligini olish

*Sekvenslash turlari*

Sanger sekvenslash — an'anaviy usul, maqsadli DNK bo'lagini aniqlashda qo'llaniladi.

Next-Generation Sequencing (NGS) — keng qamrovli va tezkor DNK sekvenslash usuli, butun genomi yoki metagenomni o'rganishda ishlatiladi.

Bioinformatik tahlil. Sekvenslash natijalari sifatida DNK ketma-ketligi olinadi (FASTQ, FASTA formatlarda).

Bu ma'lumotni kompyuterda bioinformatik dasturlar yordamida tahlil qilinadi.

*Asosiy bioinformatik tahlillar:* Sifat nazorati — sekvenslash sifatini baholash (FastQC kabi dasturlar orqali).

Ketma-ketlikni tozalash — xatoliklarni kamaytirish (adapterlar, past sifatli qismlar kesiladi).

Genom yig'ish (assembly) — qisqa ketma-ketliklarni to'liq genomga yig'ish.

Gen identifikatsiyasi — antibiotik chidamlilik genlarini topish uchun BLAST, CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database), ResFinder kabi bazalar bilan solishtirish.

Mutatsiyalarni aniqlash — referens genomga nisbatan mutatsiyalarni qidirish (SNP, indel).

Filogenetik tahlil — bakteriyalar orasidagi evolyutsion aloqalarni o'rganish.

Antibiotik chidamlilik genlarining identifikatsiyasi

CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) — antibiotik chidamlilik genlarini aniqlash uchun eng keng qo'llaniladigan ma'lumotlar bazasi[3].





Date: 17<sup>th</sup> June-2025

ResFinder — onlayn servis bo‘lib, bakteriya DNK ketma-ketligini kiritib, chidamlilik genlarini aniqlash imkonini beradi.

ARG-ANNOT, MEGARes — boshqa mashhur bazalar.

**Tahlil natijalarini talqin qilish.** Aniqlangan genlar asosida bakteriyaning qaysi antibiotiklarga chidamli ekanligi aniqlanadi.

Yangi yoki o‘zgargan genlar kashf qilinsa, ular genetik o‘zgarishlar yoki mutatsiyalar sifatida qayd etiladi.

Bu ma’lumotlar klinik shifokorlar uchun to‘g‘ri davolash strategiyasini ishlab chiqishda yordam beradi.

Ba’zi hollarda PCR mahsulotlari Sanger usulida sekvenslanib, NCBI BLAST yordamida tahlil qilindi. Shuningdek, rezistentlik genlari aniqlangan namunalar CARD (Comprehensive Antibiotic Resistance Database) va ResFinder bazalari orqali tekshirildi.

**Natijalar:** Tadqiqot natijalariga ko‘ra, ajratilgan bakterial shtammlarning katta qismi kamida bitta antibiotikka chidamli ekanligi aniqlandi. Disk diffuziya testida quyidagicha natijalar kuzatildi:

*E. coli* shtammlarining 70% ampisillin va gentamitsinga chidamli;

*K. pneumoniae* shtammlarining 60% tseftazidimiga chidamli;

*S. aureus* shtammlarining 50% vankomitsinga nisbatan qarshilik ko‘rsatdi.

PCR orqali quyidagi genlar aniqlandi:

blaTEM — 12 ta namunada

mecA — 8 ta namunada

vanA — 5 ta namunada

aac(6’)-Ib — 10 ta namunada

Bu genlarning mavjudligi bakteriyalarning keng ko‘lamli antibiotiklarga chidamliligini ko‘rsatadi.

**Muhokama:** Olingan natijalar antibiotiklarga chidamli bakteriyalar keng tarqalganligini tasdiqlaydi. Ayniqsa, blaTEM va aac(6’)-Ib genlarining yuqori uchrashish chastotasi betalaktam va aminoglikozid guruhidagi antibiotiklarning samaradorligini pasaytirayotganini ko‘rsatadi. mecA geni mavjud bo‘lgan *S. aureus* shtammlari metitsillin-rezistent deb baholanadi (MRSA). Bu esa shifoxonalarda infeksiyalarni davolashda qiyinchiliklar tug‘diradi.

Rezistentlik genlarining aniqlanishi ushbu shtammlar o‘rtasida gen almashinuvi (horizontal gen uzatish) sodir bo‘layotganini ko‘rsatadi[2,4].

**Xulosa:** Tadqiqot natijalari antibiotikga chidamli bakteriyalarning tarqalishini va ularning genetik asoslarini aniqlash muhimligini ko‘rsatadi. Aniqlangan genlar klinik infeksiyalarni davolashda qiyinchiliklar tug‘diruvchi asosiy omillardir. Shuning uchun, doimiy monitoring, antibiotiklarni oqilona qo‘llash va rezistentlikni aniqlovchi molekulyar usullardan foydalanish muhim ahamiyat kasb etadi.



Date: 17<sup>th</sup> June-2025

**FOYDALANILGAN ADABIYOTLAR:**

1. CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 30th ed. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2020.
2. Davies, J., & Davies, D. (2010). Origins and evolution of antibiotic resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 74(3), 417–433.
3. Partridge, S. R., Kwong, S. M., Firth, N., & Jensen, S. O. (2018). Mobile genetic elements associated with antimicrobial resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 31(4), e00088-17.
4. Zankari, E. et al. (2012). Identification of acquired antimicrobial resistance genes. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(11), 2640–2644.

