

ing on skeletal muscle hypertrophy: A case for whey protein. / Hulmi J.J., Lockwood C.M., Stout J.R. // Nutr Metab (Lond). – 2010. – Vol. 7. – P. 51.

3. Leuendorf J.E. Vitamin B6: A Long Known Compound of Surprising Complexity / Leuendorf J.E., Hendrickson C., Hellmann H. // Molecules. – 2009. – Vol. 14. – P. 329-351.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА КЛИНИЧЕСКИХ ИЗОЛЯТОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Козлова А.И., Тапальский Д.В.

Гомельский государственный медицинский университет, Беларусь
Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии

Актуальность. *Klebsiella pneumoniae* является одним из основных возбудителей инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи. В настоящее время известны две эволюционные ветви клебсиелл: классические *Klebsiella pneumoniae* (сКР – classical *K. pneumoniae*) и гипервирулентные *Klebsiella pneumoniae* (hвКР – hypervirulent *K. pneumoniae*). Группа сКР характеризуется быстрым накоплением различных детерминант устойчивости к антибиотикам. Большинство классических полирезистентных штаммов *K. pneumoniae*, выделяемых от госпитализированных пациентов, являются продуцентами β-лактамаз расширенного спектра (БЛРС) и/или карбапенемаз в комбинации с резистентностью к фторхинолонам и аминогликозидам. Группа hвКР обладает обширным набором факторов вирулентности. Характерным признаком большинства штаммов hвКР является гипермукоидность, выявляемая с помощью string-теста [1]. Изучение биологических свойств hвКР установило их способность продуцировать капсульный полисахарид (КПС), принадлежность к K1, K2, K5, K20, K54 и K57 серотипам, наличие генов вирулентности (*gmpA*, *magA*, *uge2*, *fimH*, *allS*, *kfu*, *wabG*, *iucA*, *iroN*, *terB* и других), а также большую устойчивость к бактерицидной активности комплемента и нейтрофилов. Антибиотикорезистентность большинства гипервирулентных *K. pneumoniae* остается на низком уровне, однако в настоящее время в мире уже описаны единичные штаммы hвКР, обладающие повышенным уровнем резистентности к антибиотикам (БЛРС- или карбапенемаза-продуцирующие штаммы), что может представлять серьезную угрозу для общества [2].

Цель. Сравнение биологических свойств классических и гипервирулентных клинических изолятов *K. pneumoniae*.

Материалы и методы исследования. В исследование включены 153 клинических изолята *K. pneumoniae*, выделенных в 2013-2017 гг. от

госпитализированных и амбулаторных пациентов в трех регионах Беларуси (Гомель, Минск, Могилев). Идентификация микроорганизмов осуществлялась на микробиологических анализаторах VITEK 2 Compact или на основе MALDI-TOF-масс-спектрометрии. Чувствительность к семи антибактериальным препаратам (амокси-циллину-клавуланату, азтреонаму, цефотаксиму, имипенему, меропенему, ципрофлоксацину, амикацину) определяли диско-диффузионным методом на агаре Мюллера-Хинтона. При выполнении исследования, учете и интерпретации результатов руководствовались стандартами EUCAST v.6.0.

Для изолятов *K. pneumoniae* с выявленной диско-диффузионным методом нечувствительностью (устойчивостью или умеренной устойчивостью) хотя бы к одному из карбапенемов методом ПЦР в реальном времени осуществлялась детекция генов карбапенемаз KPC, OXA-48 (диагностический набор «АмплиСенс MDR KPC/OXA-48-FL», ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Российская Федерация) и МБЛ групп VIM, IMP, NDM (диагностический набор «АмплиСенс MDR MBL-FL», ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Российская Федерация). Экстракцию ДНК бактериальных культур, амплификацию с гибридационно-флуоресцентной детекцией в режиме «реального времени» на амплификаторе RotorGene 3000 (Corbett Research, Австралия), анализ и интерпретацию полученных результатов выполняли в соответствии с инструкциями производителя диагностических наборов.

Гипермукоидный фенотип штаммов определяли при постановке string-теста с использованием суточной культуры, выращенной на коммерческом кровяном агаре с 5% бараньих эритроцитов. Тест считали положительным, если за бактериологической петлей тянулся слизистый тяж высотой более 5 мм от поверхности питательной среды.

Для изучения устойчивости к бактерицидному действию сыворотки крови смешивали бактериальную суспензию с оптической плотностью 0,5 по МакФарланду, предварительно разведенную изотоническим раствором хлорида натрия в 100 раз, с человеческой сывороткой, полученной от нескольких здоровых доноров, в соотношении 1:3. Дважды (непосредственно после взаимодействия с сывороткой и через 2 часа инкубации при 37°C) проводился количественный высеv 100 мкл полученной смеси на 90-мм чашки Петри с питательным агаром (HiMedia, Индия) для определения концентрации жизнеспособных бактериальных клеток. Серорезистентность культур представляли как соотношение концентрации микробных клеток после 2-часовой инкубации к их стартовой концентрации в смеси, выраженное в процентах.

Интенсивность образования микробных биопленок сКР и hvКР изолятами оценивали в 96-луночных полистироловых планшетах в соответствии с методикой Stepanovic [3]. В качестве бульонной питательной среды использовали бульон с сердечно-мозговой вытяжкой (BD, США), тестирование проводили в объеме 100 мкл. Измерение оптической плотности полученных спиртовых экстрактов кристаллического фиолетового выполняли на многофункциональном микропланшетном ридере Infinite M200 (TECAN) при длине волны 540 нм. Исследование выполняли в трех повторах.

Результаты. Из 153 изолятов *K. pneumoniae* гипермукоидный фенотип (положительный результат string-теста) выявлен у 20 изолятов (13,1%). Штаммы с гипермукоидным фенотипом обладали меньшей резистентностью к антибиотикам и были нечувствительными к $3,35 \pm 0,58$ из 7 антибиотиков, включенных в исследование, штаммы с классическим фенотипом были устойчивы к $4,98 \pm 0,18$ антибиотикам, $p=0,0006$.

Всего обнаружено 20 продуцентов карбапенемаз (NDM – 14 изолятов, OXA-48 – 6 изолятов). Только один изолят *K. pneumoniae* с выявленной продукцией карбапенемаз (карбапенемаза OXA-48) относился к гипермукоидному фенотипу, таким образом частота карбапенемрезистентности, связанная с продукцией карбапенемаз, была значительно выше у штаммов из группы сКР (14,3%) по сравнению с группой hvКР (5,0%, $p<0,05$).

Для исключения влияния на результаты исследования различий в антибиотикорезистентности штаммов из сравниваемых групп была сформирована контрольная группа из 30 сКР-штаммов, имеющих сходные с опытной группой (20 гипермукоидных штаммов) профили антибиотикорезистентности (нечувствительность к $3,53 \pm 0,20$ антибиотикам).

Известно, что гипермукоидность штаммов тесно взаимосвязана с синтезом капсульных полисахаридов, которые обеспечивают большую устойчивость бактериальных патогенов к антимикробным сывороточным факторам, таким, как фагоцитарная активность и комплементзависимый лизис. В нашем исследовании отмечена большая резистентность к человеческой сыворотке у гипермукоидных штаммов *K. pneumoniae* ($45,7 \pm 6,1\%$) в сравнении с немуккоидными ($25,8 \pm 2,9\%$, $p=0,0063$).

Штаммы *K. pneumoniae* с гипермукоидным фенотипом обладали более выраженной способностью к формированию микробных биопленок по сравнению с немуккоидными штаммами (OD_{540} соответственно $0,455 \pm 0,066$ и $0,256 \pm 0,024$; $p=0,0094$).

Выводы. Подавляющее большинство гипермукоидных штаммов обладали низким уровнем резистентности к антибиотикам, повышен-

ной устойчивостью к действию сыворотки крови и повышенной биопленкообразующей способностью в сравнении с немуккоидными штаммами, что в целом согласуется с литературными данными. Заслуживает отдельного внимания обнаружение одного гипермукоидного штамма *K. pneumoniae*, сочетающего в себе признаки гипервирулентности и экстремальной антибиотикорезистентности (устойчивость ко всем тестируемым антибиотикам, продукция карбапенемазы ОХА-48). Направлением дальнейших исследований будет поиск генетических маркеров высокой вирулентности у штаммов *K. pneumoniae* с выявленным гипермукоидным фенотипом.

Литература

1. Bialek-Davenet S., Criscuolo A., Ailloud F. et al. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerg. Infect. Dis.* 2014; 20(11): 1812-1820.
2. Turton J.F., Perry C., Elgohari S., Hampton C.V. PCR characterization and typing of *Klebsiella pneumoniae* using capsular type-specific, variable number tandem repeat and virulence gene targets. *J. Med. Microbiol.* 2010; 59: 541-547.
3. Stepanovic S., Vukovic D., Hola V. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. *APMIS.* 2007; 115(8): 891-899.

АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ БИОПЛЁНОЧНЫХ БАКТЕРИЙ, ВЫДЕЛЕННЫХ ПРИ ПИЕЛОНЕФРИТАХ

Лагун Л.В.

Гомельский государственный медицинский университет, Беларусь
Кафедра микробиологии, вирусологии и иммунологии

Актуальность. Одним из факторов патогенности микроорганизмов является образование биопленок. С их образования также начинается развитие любой инфекции, в том числе и инфекции мочевыделительной системы, в частности пиелонефрита [1, 2]. Для практической медицины особенно важно, что бактерии в биопленках обладают повышенной выживаемостью в присутствии факторов иммунной защиты макроорганизма и антибактериальных препаратов [3]. Таким образом, существование биопленок при инфекциях требует совершенно новых подходов к их диагностике и лечению, в том числе исследование антибиотикорезистентности биопленочных бактерий и изучение причин устойчивости бактерий к антибиотикам в биопленках.

Цель. Изучить антибиотикорезистентность биопленочных бактерий, выделенных при пиелонефритах.