

организма к действию факторов среды обитания. Анализ параметров КЭК свидетельствует о развитии утомления ССС практически у всех учащихся: средние значения показателя колеблются в пределах 3330–3960. При этом статистически достоверных гендерных, а также между детьми, в УО-1 и УО-2, различий установлено не было.

Определить потенциальную способность организма ребенка адаптироваться к учебному режиму школы и физическим нагрузкам, направленность изменения здоровья и физической тренированности при динамическом наблюдении позволяет оценка адаптационного потенциала, интегрально отражающего функциональное состояние организма. Установлено, что обучение сопровождается значительным ухудшением АП детей. Так, в среднем, если в начальной школе численность учащихся с неудовлетворительной адаптацией и срывом адаптации составила 30,40 %, то в базовой школе (5–9 классы) — 44,67 %.

Выводы

Были получены данные, на основании которых можно свидетельствовать об ухудшении состояния здоровья учащихся, как на базе УО-1 и УО-2, с увеличением ступени обучения, а именно: формирование хронической патологии, нарушение процессов роста и развития, адаптационно-приспособительных механизмов. Наряду с вышеизложенным, результаты работы обуславливают необходимость поиска причинно-следственных связей с целью разработки и внедрения и реализации профилактических мероприятий, направленных на сохранение и укрепление состояния здоровья детей и подростков в данных учреждениях образования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Динамика состояния здоровья детей и подростков в образовательных учреждениях Республики Башкортостан / А. Г. Муталов [и др.] // Медицинский вестник Башкортостана. — 2012. — № 6. — С. 98–102.
2. *Порецкова, Г. Ю.* Профилактика и раннее выявление нарушений развития и состояния здоровья школьников: комплексный медико-психолого-педагогический подход / Г. Ю. Порецкова, Д. В. Печуров, Л. И. Фишман // Профилактика школьнообусловленной патологии — реальный путь улучшения состояния здоровья детского населения. — Самара: ООО ПК «ДСМ», 2014. — С. 177–179.
3. Комплексная оценка физического развития и состояния здоровья учащихся образовательных учреждений города Самары / И. И. Березин [и др.] // Известия Самарского научного центра Российской академии наук. — 2010. — № 1. — С. 1802–1807.
4. *Кучма, В. Р.* Гигиенические проблемы жизни детей в мегаполисе / В. Р. Кучма // Экологические и медицинские проблемы возникновения донозологических и патологических состояний в условиях мегаполисов: материалы первой Междунар. науч. конф., Санкт-Петербург, 9–10 июня 2005 г. / под ред. М. П. Захарченко, А. А. Редько. — СПб., 2005. — С. 27–28.
5. Новые возможности профилактической медицины в решении проблем здоровья детей и подростков. Комплексная программа научных исследований «Профилактика наиболее распространенных болезней детей и подростков на 2005–2009 гг.» / А. А. Баранов [и др.]. — М.: ГЭОТАР-Медиа, 2006. — 120 с.

УДК 579.842.16:579.252.55:615.33

КИНЕТИКА РОСТА АНТИБИОТИКОЧУВСТВИТЕЛЬНЫХ И ЭКСТРЕМАЛЬНО-АНТИБИОТИКОРЕЗИСТЕНТНЫХ ШТАММОВ *KLEBSIELLA PNEUMONIAE*

Топальский Д. В.¹, Петренев Д. Р.², Чернышева А. Р.¹, Филиппова В. А.¹

¹Учреждение образования

«Гомельский государственный медицинский университет»,

²Государственное научное учреждение

«Институт радиобиологии Национальной академии наук Беларуси»

г. Гомель, Республика Беларусь

Введение

Наличие метало-β-лактамаз и сериновых ОХА-карбапенемаз у *Klebsiella pneumoniae* является важным маркером экстремальной антибиотикорезистентности, поскольку оно ассоциируется с устойчивостью ко всем β-лактамам и большинству не β-лактаменных антибиотиков. Гены карбапенемаз как правило локализованы на мобильных генетических элементах и способны быстро распространяться не только внутри одной популяции микроорганизмов, но и между микроорганизмами разных видов, что существенно осложняет эпидемиологическую обстановку в учреждениях здравоохранения и приводит к быстрому нарастанию устойчивости к антибиотикам [1].

Приобретение микроорганизмами множества генетических детерминант устойчивости к антибиотикам в ряде случаев сопровождается снижением скорости их роста и размножения, а также к снижением конкурентоспособности в отношении антибиотикочувствительных штаммов того же вида [2–4].

Цель

Сравнить кинетику микробного роста и конкурентоспособность антибиотикочувствительных и экстремально-антибиотикорезистентных карбапенеморезистентных изолятов *K. pneumoniae*.

Материал и методы исследования

В исследование включены 32 неповторяющихся экстремально-антибиотикорезистентных клинических изолята *K. pneumoniae*, выделенных в 2014–2016 гг. от госпитализированных пациентов в Гомеле, Минске и Могилеве. В качестве контрольных отобраны 14 клинических изолятов *K. pneumoniae* с сохраненной чувствительностью к большинству антибиотиков. Видовая идентификация микроорганизмов проводилась с использованием коммерческих тест-систем API 20E (bioMérieux, Франция) или при помощи автоматического микробиологического анализатора VITEK 2 Compact идентификационных картах VITEK 2 GN (bioMérieux, Франция). Редентификация микроорганизмов выполнена методом матричной лазерной времяпролетной масс-спектрометрии (MALDI — TOF) на анализаторе VITEK MS (bioMérieux, Франция). Все изоляты были устойчивы к карбапенемам в результате продукции карбапенемаз различных классов (NDM-1 — 6 изолятов, OXA-48 — 13 изолятов, KPC — 13 изолятов) и сохраняли чувствительностью только к тигециклину и полимиксинам. Фенотипическая детекция продукции карбапенемаз выполнена в модифицированном Ходж-тесте, основанном на способности карбапенемочувствительного штамма *E. coli* ATCC 25922 расти вокруг диска с эртапенемом в непосредственной близости с карбапенеморезистентными исследуемыми штаммами, продуцирующими карбапенемазы.

Выявление генов карбапенемаз проведено в режиме мультиплексной ПЦР в реальном времени (термоциклер Rotor Gene 3000, Corbett Research, Австралия) с использованием диагностических наборов AmpliSens MDR KPC/OXA-48-FL» и «AmpliSens MDR MBL-FL», (ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии, г. Москва) в соответствии с инструкциями изготовителя. Выделение бактериальной ДНК для ПЦР выполняли с помощью температурного лизиса в ТЕ-буфере.

Из культур микроорганизмов в логарифмической фазе роста готовили суспензию с оптической плотностью 0,5 McFarland ($1,5 \times 10^8$ микробных клеток/мл), которой инокулировали бульон Мюллера — Хинтона (стартовая концентрация — 10^6 микробных клеток/мл). Тестирование выполняли в трех повторах в 96-луночных плоскодонных планшетах (Sarstedt, Германия) на многофункциональном микропланшетном ридере Infinite M200 (TECAN) в течение 24 ч при температуре 37 °С. Объем бульонной культуры в каждой ячейке — 250 мкл, для предотвращения испарения жидкости и изменения объема среды в ячейках планшеты после инокуляции закрывались входящими в комплект оптически прозрачными крышками. Измерение оптической плотности на длине волны 600 нм (OD_{600}) выполнялось каждые 15 мин. Каждому измерению OD_{600} предшествовало круговое перемешивание (амплитуда 3 мм, скорость 44 об./мин) продолжительностью 1 мин. Полученные кинетические кривые анализировали с помощью программы «Magellan» 6.6 (TECAN), оценивали максимальный угол наклона кинетической кривой ($\Delta OD_{600} \times h^{-1}$) в стадии экспоненциального роста, рассчитанный по пяти последовательным точкам. Расчетное теоретическое время первого удвоения популяции считали временем окончания периода адаптации культуры.

Для изучения конкурентных взаимоотношений бульон Мюллера — Хинтона инокулировали одновременно двумя штаммами (антибиотикочувствительным и продуцентом карбапенемаз) в соотношении 1:1, стартовая концентрация каждого из штаммов в бульоне — 500 тыс. микробных клеток/мл. Всего подобрано 11 пар, в которых в качестве антибиотикорезистентного изолята выступали продуценты карбапенемаз OXA-48 (3 пары), KPC и NDM (по 4 пары). В качестве контролей все штаммы, включенные в пары, также исследовались в виде монокультур. Инкубация при 37 °С с периодическим встряхиванием выполнялась на приборе

Infinite M200. По окончании инкубации из содержимого ячеек готовили 10-кратные серийные разведения в стерильном 0,85 % растворе хлорида натрия, и делали количественные высева из разведений на агар Мюллера — Хинтона и агар Мюллера — Хинтона с 8 мкг/мл левофлоксацина (селективная среда для подавления роста антибиотикочувствительных штаммов). После 18-часовой инкубации при 35 °С проводили подсчет колоний на чашках с обычной и селективной средой и рассчитывали концентрации каждого из штаммов в смеси.

Константу скорости отбора s , выраженную в обратных часах (h^{-1}) определяли исходя из регрессионной модели [5]:

$$\log_e R_{(t)} = \log_e R_{(0)} + st,$$

где $R_{(0)}$ и $R_{(t)}$ — соотношения концентраций двух конкурирующих изолятов (резистентного и чувствительного) в начале эксперимента и по окончании инкубации, t — продолжительность инкубации.

Результаты исследования и их обсуждение

Продолжительность индуктивной фазы не имела значимых отличий у антибиотикочувствительных и карбапенеморезистентных изолятов *K. pneumoniae*. Скорость роста в экспоненциальную стадию была выше у антибиотикочувствительных изолятов ($\Delta OD_{600} 0,1948 \pm 0,0183 h^{-1}$) по сравнению с продуцентами карбапенемаз (NDM: $\Delta OD_{600} 0,1310 \pm 0,0096 h^{-1}$, $p = 0,0410$; OXA-48: $\Delta OD_{600} 0,1272 \pm 0,0045 h^{-1}$, $p = 0,0019$; KPC: $\Delta OD_{600} 0,1295 \pm 0,0032 h^{-1}$, $p = 0,0023$).

В экспериментах с парными (антибиотикочувствительной и экстремально-антибиотикорезистентной) культурами для 10 из 11 пар финальные концентрации антибиотикочувствительных штаммов в смеси превышали концентрации продуцентов карбапенемаз в 1,25–39 раз (в среднем в 10,3 раза), и только для одной пары соотношение концентраций чувствительного и устойчивого штамма составило 0,8. Константы скорости отбора s для пар с продуцентами NDM находились в диапазоне от $-0,0964$ до $0,0093$ (среднее значение $-0,0480$), для пар с продуцентами OXA-48 — от $-0,1227$ до $-0,0258$ (среднее $-0,0818$), для пар с продуцентами KPC — от $-0,1526$ до $-0,0169$ (среднее $-0,0749$). Отрицательные значения константы s указывают на низкую конкурентоспособность большинства карбапенеморезистентных штаммов при их совместном культивировании со штаммами, сохраняющими чувствительность к антибиотикам. При исследовании контролей (бульонных монокультур) показано отсутствие роста всех антибиотикочувствительных штаммов на селективной среде с 8 мкг/мл левофлоксацина, и отсутствие влияния указанной концентрации левофлоксацина на количественные параметры роста антибиотикорезистентных культур (финальные концентрации для антибиотикорезистентных монокультур, рассчитанные в высевах на обычных и селективных средах, полностью совпадали).

Выводы

Выявленные отличия в кинетике микробного роста свидетельствуют о низкой конкурентоспособности большинства экстремально-антибиотикорезистентных штаммов *K. pneumoniae*, продуцирующих карбапенемазы NDM, OXA-48 и KPC. Тем не менее, наблюдаемое широкое распространение этих изолятов в госпитальной среде может поддерживаться массивным использованием антибактериальных препаратов, создающим дополнительные конкурентные преимущества за счет вытеснения антибиотикочувствительных бактерий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Pitout, J. D. D. Carbapenemase-producing *Klebsiella pneumoniae*, a key pathogen set for global nosocomial dominance / J. D. D. Pitout, P. Nordmann, L. Poirel // *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. — 2015. — Vol. 59, № 10. — P. 5873–5884.
2. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* is associated with decreased fitness / Z. Suna [et al.] // *Cell Physiol Biochem*. — 2013. — Vol. 31. — P. 347–354.
3. Impact of bla_{NDM-1} on fitness and pathogenicity of *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* / S. Gottig [et al.] // *International Journal of Antimicrobial Agents*. — 2016. — Vol. 47(6). — P. 430–435.
4. Synthesis of metallo- β -lactamase VIM-2 is associated with a fitness reduction in *Salmonella enteric* Serovar Typhimurium / N. F. Cordeiro [et al.] // *Antimicrob Agents Chemother*. — 2014. — Vol. 58(11). — P. 6528–6535.
5. Lenski, R. E. Genetic analysis of a plasmid-encoded, host genotype-specific enhancement of bacterial fitness / R. E. Lenski, S. C. Simpson, T. T. Nguyen // *Journal of Bacteriology*. — 1994. — Vol. 176 (11). — P. 3140–3147.