

На правах рукописи

СЕМЕНОВА ДИНА РАШИДОВНА

**КЛИНИКО-БАКТЕРИОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА
ВНЕ- И ВНУТРИБОЛЬНИЧНОЙ КЛЕБСИЕЛЛЁЗНОЙ ИНФЕКЦИИ
У ДЕТЕЙ**

3.1.22. Инфекционные болезни

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Казань - 2022

Работа выполнена в федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Научный руководитель:

доктор медицинских наук, доцент

Николаева Ирина Венидиктовна

Официальные оппоненты:

Усенко Денис Валериевич – доктор медицинских наук, ведущий научный сотрудник клинического отделения инфекционной патологии, профессор образовательного центра федерального бюджетного учреждения науки «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Федеральной службы по надзору в сфере защиты прав потребителей и благополучия человека.

Михайлова Елена Владимировна – доктор медицинских наук, профессор, заведующая кафедрой инфекционных болезней у детей и поликлинической педиатрии им. Н.Р. Иванова федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Ведущая организация: федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение дополнительного профессионального образования «Российская медицинская академия непрерывного профессионального образования» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Защита диссертации состоится «15» декабря 2022 г. в _____ часов на заседании объединенного диссертационного совета 99.2.061.02 при федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении «Казанский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации и федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Приволжский исследовательский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации по адресу: 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, д.49.

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России (420012, г. Казань, ул. Бутлерова, 49 б) и на сайте организации (www.kazangmu.ru).

Автореферат разослан « _____ » _____ 2022 г.

Учёный секретарь

диссертационного совета,

доктор медицинских наук, доцент

Тaufеева Елена Анатольевна

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. Клебсиеллы являются типичными «оппортунистами» и часто обнаруживаются в составе микробиоты желудочно-кишечного тракта (ЖКТ) и верхних дыхательных путей (ВДП) у здоровых детей и взрослых (Бондаренко В.М. 2008, Усенко Д.В. 2011, Martin R.M. 2018). Факторами риска развития клебсиеллёзной инфекции (КИ) являются: сахарный диабет, иммуносупрессия, оперативные вмешательства и др. (Гельфанд Б. Р. 2016, Фесенко О.В. 2015, Raszczak M. 2016). К группе высокого риска развития клебсиеллёза относятся новорожденные и дети грудного возраста, имеющие «незрелую» микробиологическую и иммунную систему (Хаертынов Х.С. 2018, Verma P. 2015).

Клебсиеллы являются возбудителями острых кишечных инфекции (ОКИ), гнойно-воспалительных заболеваний (ГВЗ) новорожденных, пневмонии, менингита, сепсиса, инфекций мочевых путей (ИМП) и др. (Горелов А.В. 2006, Мазанкова Л.Н. 2018, Broberg C.A. 2014, Janda J.M. 2015). В настоящее время актуальным является распространение мультирезистентных (MDR) штаммов *Klebsiella* spp., возглавляющих этиологическую структуру инфекций, связанных с оказанием медицинской помощи, у детей во всем мире, и являющихся основными возбудителями неонатального сепсиса (Лекманов А.У. и соавт. 2021, Хаертынов Х.С. и соавт. 2017, Самсыгина Г.А. 2012, Gupta A. 2016). Вспышки клебсиеллёза у детей продолжают регистрироваться в разных странах и характеризуются тяжестью течения и высокой летальностью (Gu D. et al. 2018, Bor M. 2021, Sánchez–Romero I. et al. 2012, Gupta A. 2016). Наибольшую актуальность представляют штаммы клебсиелл, продуцирующие β -лактамазы расширенного спектра (БЛРС) и карбапенемазы, частота выделения которых у детей и взрослых возрастает во всем мире (Сидоренко С. В. 2004, Campos A.C. 2016, Garza-Ramos U. 2016).

Развитие инфекционного процесса и тяжесть его течения у пациента во многом зависят от патогенности штаммов *Kl. pneumoniae* (КР), среди которых наиболее значимыми являются: капсула, липополисахарид, фимбрии 1-го и 3-го типов, сидерофоры и др. (Бондаренко В.М. 2008, Raszczak M. 2016, Janda J. M. 2015). С середины 80-х годов отмечен рост числа внебольничных инвазивных форм

клебсиеллёза (абсцесс печени, менингит, сепсис и др.) у здоровых взрослых людей, вызванных «гипервирулентными» штаммами *Kl. pneumoniae* (hvKP), с высокой летальностью (Lee C.R. 2016, Shon A.S. 2013). Отличительной особенностью «гипервирулентных» штаммов является наличие гена *gmpA* и гипермукоидный фенотип клебсиелл (Kumabe A. 2014, Lin Y.T. 2010, Dorman, M.J. 2017). В литературе имеются описания единичных случаев инфекций, вызванных hvKP у детей (Khaertynov K.S. 2017, Gu D.X. 2016, Kishibe S. 2016). Распространенность «гипервирулентных» штаммов клебсиелл в детской популяции не изучалась. В настоящее время имеется необходимость изучения клинико-бактериологических особенностей внебольничного и внутрибольничного клебсиеллёза у детей, в том числе инфекций, вызванных «гипервирулентными» штаммами *Kl. pneumoniae*.

Степень разработанности темы. В последние десятилетия большинство исследований посвящены изучению клинических проявлений и факторов риска развития нозокомиального клебсиеллёза у детей, а также антибиотикорезистентности и вирулентности штаммов *Kl. pneumoniae*, вызывающих вспышки заболевания в стационарах и родильных домах (Х. С. Хаертынов и соавт. 2018, Gupta A. 2016, P. Verma 2015). В литературе практически отсутствуют данные об особенностях клинических проявлений и микробиологических характеристиках (факторы патогенности, антибиотикорезистентность) возбудителей внебольничного клебсиеллёза у детей. Несмотря на многочисленные публикации, посвященные изучению проблемы диагностики и лечения инфекций, вызванных «гипервирулентными» штаммами *Kl. pneumoniae* у взрослых, в литературе имеются единичные сообщения о клинических проявлениях данной инфекции у детей.

В связи с этим изучение современных особенностей клинических проявлений и микробиологических характеристик возбудителей внутрибольничного и внебольничного клебсиеллёза у детей позволит оптимизировать диагностику и лечение данной инфекции.

Цель исследования: оптимизация диагностики и лечения внебольничной и внутрибольничной клебсиеллёзной инфекции у детей.

Задачи исследования:

1. Определить видовой состав и частоту кишечной колонизации различными видами клебсиелл здоровых детей раннего возраста.

2. Изучить клинико-лабораторные особенности внебольничной и внутрибольничной клебсиеллёзной инфекции у новорожденных детей и определить перинатальные факторы риска развития нозокомиального клебсиеллёза.

3. Провести детекцию генов факторов патогенности, изучить антибиотикорезистентность клинических изолятов *Kl. pneumoniae*, выделенных от детей с различными формами внутрибольничной и внебольничной клебсиеллёзной инфекции.

4. Изучить частоту инфицирования детей «гипервирулентными» штаммами *Kl.pneumoniae* и особенности клинических проявлений инфекции, вызванных данным микробом, а также определить диагностическую ценность стринг-теста для скрининговой детекции «гипервирулентных» штаммов *Kl. pneumoniae*.

Научная новизна исследования. В работе впервые:

1. Показаны клинико-лабораторные особенности внутрибольничной и внебольничной КИ у новорожденных детей в сравнительном аспекте. Выявлено, что внебольничная КИ у новорожденных детей проявляется среднетяжелыми и легкими формами поражения желудочно-кишечного тракта и ГВЗ (пиодермия – у 88%, омфалит – у 81%, гнойный конъюнктивит – у 25%). Неонатальная внутрибольничная вспышка КИ характеризуется высокой частотой развития сепсиса (73%) с формированием очагов остеомиелита, гнойного артрита, венитрикулита, некротизирующего энтероколита и синдрома диссеминированного внутрисосудистого свертывания (ДВС) (46%).

2. Определена частота инфицирования детей и описаны варианты клинических проявлений инфекции, вызванной «гипервирулентными» штаммами *Kl. pneumoniae*. Выявлено, что 11-32% детей с КИ инфицированы «гипервирулентными» штаммами клебсиелл. Инфекции, вызванные hvKP, проявляются нетяжелыми формами кишечной инфекции (25%) и инфекции

мочевых путей (15%), а также бессимптомным носительством микроба в зева и в кишечнике (60%).

3. Выявлено, что стринг-тест обладает высокой чувствительностью (Se 95%) и специфичностью (Sp 96,9%) и может быть использован для скрининга «гипервирулентных» штаммов *Kl. pneumoniae* в клинической практике.

4. Показано многообразие генотипов внебольничных штаммов *Kl. pneumoniae*, которые обладали высокой чувствительностью к антибиотикам, но имели высокий адгезивный и «гипервирулентный» потенциал. Определена потенциальная генотоксичность штаммов *Kl. pneumoniae*, связанная с наличием гена колибактина, который чаще выявлялся у штаммов клебсиелл, вызывающих инвазивную инфекцию (17,4%), чем у штаммов, колонизирующих кожу и ЖКТ (2,3%).

Теоретическая и практическая значимость исследования.

Получены новые данные о частоте колонизации различными видами клебсиелл у здоровых детей, начиная с периода новорожденности и до 3-х лет. Выявлено, что для детей раннего возраста характерна высокая частота кишечной колонизации и высокий популяционный уровень *Kl. pneumoniae*, при котором возможно развитие инфекционного процесса.

Доказано, что во внутрибольничных условиях преобладают полирезистентные штаммы *Kl. pneumoniae*, обладающие высоким сродством к железу. Внебольничные штаммы обладают высокой чувствительностью к антибиотикам и имеют высокий адгезивный и «гипервирулентный» потенциал. Описаны клинико-лабораторные особенности проявлений внутрибольничной и внебольничной КИ, в том числе, вызванных «гипервирулентными» штаммами *Kl. pneumoniae*.

Определены значимые факторы риска развития неонатального клебсиеллёза: недоношенность (OR=13,125 [1,3-126,3]) и искусственное вскармливание (OR=28 [3,9-196,4]). Представлены схемы эмпирической антимикробной терапии внутрибольничной и внебольничной КИ у детей. Обосновано проведение стринг-теста для скрининга «гипервирулентных» штаммов *Kl. pneumoniae*.

Результаты исследования рекомендуются для использования в практической деятельности педиатров, инфекционистов и внедрены в работу ГАУЗ Республиканской клинической инфекционной больницы (ГАУЗ «РКИБ»), детских поликлиник № 7 и № 10, детского стационара при городской клинической больнице № 18 г. Казани. Теоретические положения и практические рекомендации используются в учебном процессе на кафедре детских инфекций и кафедре пропедевтики детских болезней и факультетской педиатрии ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России. По материалам исследования разработаны методические рекомендации для врачей «Кишечные инфекции у новорожденных детей. Диагностика. Лечение».

Методология и методы исследования. Работа выполнена в дизайне обсервационного ретроспективного сравнительного аналитического и поперечного исследований. На различных этапах диссертационного исследования использовались клинико-лабораторный, микробиологический, аналитический и статистический методы.

Положения, выносимые на защиту:

1. Дети грудного возраста часто инфицированы штаммами *Kl. pneumoniae*, обладающими высоким патогенным потенциалом без клинических проявлений. Инфекции, вызванные «гипервирулентными» штаммами *Kl. pneumoniae*, проявляются у грудных детей преимущественно нетяжелыми формами острых кишечных инфекций, инфекций мочевых путей и бессимптомным носительством.

2. Внутрибольничная и внебольничная клебсиеллёзная инфекция у новорожденных детей характеризуются различным спектром клинических проявлений. Внебольничная клебсиеллёзная инфекция преимущественно протекает с поражением кожи, пищеварительного тракта, мочевых путей. Внутрибольничная клебсиеллёзная инфекция характеризуется тяжелым течением и высокой частотой развития инвазивных форм: менингит, сепсис, пневмония.

3. Госпитальные штаммы *Kl. pneumoniae* характеризуются множественной устойчивостью к антибиотикам и повышенной способностью к утилизации железа.

Внебольничные штаммы *Kl. pneumoniae* обладают высокой чувствительностью к антибиотикам и имеют высокий адгезивный и «гипервирулентный» потенциал.

Степень достоверности и апробация результатов исследования.

Материалы диссертации обсуждены и доложены на XI Российской конференции «Педиатрия и детская хирургия в Приволжском федеральном округе» (Казань, 2015); Международной научной конференции студентов, аспирантов, молодых ученых «Ломоносов 2016» (Москва, 2016); Юбилейной научно-практической конференции, посвященной 100-летию профессора А.Е. Резника (Казань, 2016); III Всероссийской конференции студентов и молодых ученых «Социально–значимые инфекции XXI века» (Казань, 2017); Всероссийском конгрессе по инфекционным болезням с международным участием (Казань, 2017); 92-й Всероссийской научно-практической конференции студентов и молодых ученых (Казань, 2018), V Международной научно-практической конференции «Современные биотехнологии для науки и практики» (Санкт-Петербург, 2018), X Ежегодном Всероссийском Конгрессе по инфекционным болезням (Москва, 2018). По результатам исследования опубликовано 26 научных работ, в том числе 7 статей в рецензируемых научных журналах, определенных ВАК при Министерстве науки и высшего образования Российской Федерации (в том числе 4 в изданиях, включенных в Scopus) и 2 статьи опубликованы в международных журналах, индексируемых в Scopus.

Личное участие автора заключалось в предложении основной идеи исследования, выборе методологии и методов его выполнения. Автором непосредственно проводился отбор пациентов для включения в исследование и разработка программы обследования. Автор принимал непосредственное участие в процессе клинических и лабораторных исследований, самостоятельно проводил сбор, статистическую обработку и анализ всего клинического материала, лично подготовил к печати публикации по теме диссертации.

Структура и объём диссертации. Диссертация изложена на 127 страницах, содержит 29 таблиц, 8 рисунков, состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, главы результатов собственных исследований,

заклучения, выводов, практических рекомендаций, списка литературы, включающего 190 источников, в том числе 49 отечественных и 141 зарубежных.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Работа выполнена на базе кафедры инфекционных болезней ФГБОУ ВО Казанский ГМУ Минздрава России, набор пациентов осуществлялся в ГАУЗ «РКИБ», ГАУЗ Детской Республиканской клинической больницы МЗ РТ (ГАУЗ «ДРКБ МЗ РТ») в период с 2015 по 2019 гг.

Внутрибольничными считали случаи КИ, развившиеся у новорождённых детей в условиях родильного дома в сроки более 48 часов после рождения.

К внебольничным были отнесены случаи КИ, развившиеся у детей в первые 48 часов жизни, а также в амбулаторных условиях в сроки более 48 часов после выписки из роддома или стационара. С разрешения этического комитета, после оформления согласия на медицинское вмешательство были сформированы 3 группы обследованных детей:

1. Определение видового состава и частоты кишечной колонизации различными видами клебсиелл здоровых детей раннего возраста (поперечное исследование). Проведено исследование состава кишечной микрофлоры бактериологическим методом у 456 «условно» здоровых детей раннего возраста, из них мальчиков (48,7%), девочек (51,3%).

2. Изучение клинико-лабораторных особенностей течения внебольничного клебсиеллёза и внутрибольничной вспышки КИ и оценка факторов риска развития клебсиеллёзного сепсиса у новорожденных детей (обсервационное ретроспективное сравнительное аналитическое исследование). Проанализированы истории болезни 16 новорожденных детей с внебольничной КИ и 15 детей из внутрибольничной вспышки КИ, развившейся в одном из родильных домов г. Казани в 2015 г. При внутрибольничной (нозокомиальной) клебсиеллезной инфекции (НКИ) 47% детей были недоношенные, 40% детей были рождены путем кесарева сечения. Патология раннего неонатального периода диагностирована у 66,6% детей. Отягощенный

акушерский анамнез выявлен у 13,3%, гинекологическая патология у 13,3%, патология беременности – у 6,6% матерей. Новорожденные с внебольничной клебсиеллёзной инфекцией (ВКИ) госпитализировались в инфекционную больницу из родильных домов (в первые сутки жизни) или из домашних условий. Патология раннего неонатального периода диагностирована у 50% детей. 17% детей были недоношенными, 25% рождены путем кесарева сечения. Отягощенный акушерский анамнез выявлен у 12%, патология беременности – у 12,5% матерей.

3. Изучение патогенности и антибиотикорезистентности внутрибольничных и внебольничных штаммов *Kl. pneumoniae* (экспериментальное исследование). Изучена чувствительность к антибиотикам и проведена детекция генов патогенности у 85 штаммов КР, выделенных у новорожденных и грудных детей с ВКИ (n=50) и спорадической НКИ (n=35), получавших стационарное лечение в ГАУЗ «РКИБ» и ГАУЗ «ДРКБ МЗ РТ» в 2016 гг. КР выделена из фекалий (49,4%), крови (5,8%), ликвора (1,2%), эндотрахеальной трубки (ЭТТ) (7,2%), мочи (14,1%), зева (22,3%) у детей с различными формами КИ (Таблица 1).

Таблица 1 – Клинические формы клебсиеллёзной инфекции

Нозологическая форма	Число детей (n=85) абс.ч. (%)
Сепсис	6 (6,0%)
ОКИ	16 (18,8%)
ИМП	12 (14,1%)
Пневмония	6 (7,2%)
Носительство КР (ВДП)	19 (22,3%)
Носительство КР (ЖКТ)	26 (30,6%)

Бактериологическое исследование фекалий, мазков с кожи, ЭТТ, ликвора, крови, мочи и др. проводили в бактериологической лаборатории ГАУЗ «РКИБ» и ГАУЗ «ДРКБ МЗ РТ».

Детекция генов патогенности *Kl. pneumoniae* *trpA* (регулятор мукоидного фенотипа), *clbB* (генотоксин), *fimH* (фимбрии 1 типа), *plc* (антилизосимный фактор), *igr2* (сидерофор) проводилась на базе ФГБУ «Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н. Ф. Гамалеи» МЗ

РФ методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) (ст. научный сотрудник, к.б.н С. В. Фиалкина). Штаммы клебсиелл, несущие ген гипермукоидного фенотипа *gmr A*, считали «гипервирулентными» (*hvKP*).

Стринг-тест для определения «гипермукоидного» фенотипа КР проводили в бактериологических лабораториях ГАУЗ «РКИБ» и ГАУЗ «ДРКБ МЗ РТ». Колонии КР выращивали на плотных питательных средах с добавлением 5 % эритроцитов барана при $t=37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 18-20 ч. Тест считали положительным, если слизь с колоний вытягивалась бактериологической петлей на 5 мм от поверхности агар.

Определение чувствительности к антибиотикам и бактериофагам штаммов *Kl. pneumoniae* проведено диско-диффузионным методом. Определена чувствительность к ампициллину/клавуланату/АМС, цефтазидиму/CAZ, цефокситину/FOX, цефепиму/ФЕР, сульфаметоксазол/триметоприму/SXT, меронему/MEM, гентамицину/GN, цефтриаксону/CRO, цефоперазону/SCF, имипенему/IPM, ципрофлоксацину/CIP, эртапенему/ЕТР, нитрофурантоину/FT, амикацину/AN.

Для **статистической обработки** результатов использованы программы: «Microsoft Excel 2007», «Statistica 10,0». Методами вариационной статистики рассчитывали: в случаях правильного распределения: среднее значение (*M*), стандартное отклонение (*SD*), критерий Стьюдента (*t*-критерий); при распределении признака, отличном от нормального: медиана (*Me*), межквартильный размах. Для определения достоверности различий средних сравниваемых величин (*p*) в несвязанных группах использовали критерий Манна-Уитни (*U*-критерий), в связанных группах – критерий Вилкоксона; анализ категориальных данных проводили с использованием критерия χ^2 и точного критерия Фишера (*F*-критерий) при количестве наблюдений в группе менее 5. Результаты рассматривались как статистически значимые при $p<0,05$. Операционные характеристики диагностических тестов (чувствительность - *Se* и специфичность - *Sp*) рассчитывали с использованием четырехпольных таблиц.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клебсиеллы обнаружены в фекалиях у 274 (60 %) «условно» здоровых детей раннего возраста. *Kl. pneumoniae* выделена у 59,2%, *Kl. oxytoca* - у 0,8% детей. КР присутствовала в фекалиях у 78,9 % новорожденных и 71,7% детей 1-3 месяцев жизни. У детей > 6 месяцев колонизация КР выявлялась реже (52,7%-42,1%) ($p<0,001$). Популяционный уровень КР у новорожденных составил 7,6 ($\pm 0,5$) lg КОЕ/г со снижением до 6,6 $\pm 0,5$ lg КОЕ/г у детей в возрасте 3 лет. 66,7 % штаммов КР были устойчивы к клебсиеллённому фагу и 74,1 % – к пиобактериофагу.

Проведен анализ историй болезни новорожденных из «вспышки» КИ, вызванной *Kl. pneumoniae*, и внебольничных случаев клебсиеллёза. Риск развития НКИ был в 13 раз выше у недоношенных (OR=13,1 [1,3-126,3]). Дети с НКИ имели более низкие показатели массы тела при рождении (2820,63 $\pm 176,89$ г.), чем дети с ВКИ (3462 $\pm 85,74$ г.) ($p<0,05$). Значимым фактором риска развития НКИ было искусственное вскармливание (OR=28 [3,9-196,4]). Колонизация клебсиеллами ВДП выявлялась только у детей из НКИ (33,3%) и только в данной группе выявлена бактериемия (40%). У детей с ВКИ чаще, чем при внутрибольничной выявлялась колонизация кожи (68,7% и 6,6%, $p=0,001$) и пупочной ранки (62,2% и 20%, $p=0,01$).

Внебольничная КИ проявлялась пиодермией (88%), омфалитом (81%), гнойным конъюнктивитом (25%). Лихорадка имела у 18,7%, поражение ЖКТ - у 50% (среднетяжелая формы гастроэнтерита - 6,3% и энтероколита - 43,7%), симптомы дегидратации 1 степени - у 6,3% детей. Длительность диареи составила Me 5 (4;6) дней. Продолжительность ВКИ составила Me 9 (7;11) дней. Тяжелых форм заболевания, осложнений и летальных исходов в данной группе детей не зарегистрировано.

Внутрибольничная вспышка КИ. У 11 (73 %) детей развился сепсис, у 4 (26,6%) - локализованные формы ГВЗ. Лихорадка у всех детей отсутствовала. У детей с сепсисом диагностированы пневмония (26,6%), гнойный артрит (7%), остеомиелит (7%), гнойный менингит с венрикулитом (7%), гнойный омфалит (7%), пиодермия (13,3%). Симптомы поражения ЖКТ имелись у 66,6% детей, в т.ч. некротизирующий энтероколит (НЭК) (33,3%), энтероколит (26,6%), гастроэнтерит

(6,6%). У 2(13,3%) недоношенных детей развилось желудочно-кишечное кровотечение. Для НКИ был характерен скудный стул с примесью слизи и крови с частотой до 12-15 раз и длительностью диареи $22,8 \pm 1,7$ дней. ДВС-синдром развился у 46%, эксикоз 2-3 степени – у 13,3%, септический шок – у 13,3% детей. Летальный исход наступил у 2 (13,3%) недоношенных детей с сепсисом в возрасте 5 и 12 дней (на 2 и 5 сутки заболевания). НКИ протекала более длительно, чем ВКИ (Me 15 (9;17) дней) ($p < 0,05$). Только при НКИ развивалась тромбоцитопения (73,3%) (у 46% детей тромбоцитов менее 30 тысяч в 1 мкл). Не выявлено значимых различий в развитии лейкоцитоза при НКИ (20%) и ВКИ (31,2%), однако СРБ и число палочкоядерных нейтрофилов были существенно выше у детей с НКИ ($p < 0,01$).

По результатам ПЦР детекции генов патогенности 35 внутрибольничных штаммов, выделенных при спорадических случаях НКИ, и 50 внебольничных штаммов клебсиелл обнаружено 18 генотипов в различных комбинациях. У 40% нозокомиальных и 34% внебольничных штаммов исследуемые гены не обнаружены. Внебольничные штаммы чаще обладали комбинацией двух генов, чем внутрибольничные (34% и 14,3%, $p < 0,05$). Комбинация генов *gmpA*+*fimH* выявлена у 14 %, генов *gmpA*+*irp* – у 10% внебольничных штаммов, что может быть связано с циркуляцией определенных клонов бактерий. Внутрибольничные штаммы чаще несли 3-4 гена патогенности (11,4%), чем внебольничные (2%) ($p > 0,05$).

Внебольничные штаммы КР чаще, чем внутрибольничные (32% и 11%, $p < 0,01$) обладали геном *gmpA*, что свидетельствует об их потенциальной гипервирулентности, а также геном *fimH* (36% и 14,2%, $p < 0,01$). Ген *irp* 2 чаще имелся у внутрибольничных (40%), чем у внебольничных штаммов КР (22%) ($p < 0,05$). Ген *plc* выявлен у 12% внебольничных и 17,1% внутрибольничных штаммов КР ($p > 0,05$). У штаммов, выделенных из крови, мочи, ЭТТ ген *clbB* выявлялся чаще (17,4%), чем у штаммов КР, выделенных из фекалий и зева (2,3%) ($p < 0,05$), что свидетельствует о возможной роли колибактина в развитии инвазивных форм клебсиеллёза у детей.

Внутрибольничные штаммы КР (n=35), выделенные при спорадических случаях КИ у детей, были резистентны к АМС (60%), SXT (57%), GN (28%), CIP (22%), FT (22%). 71% штаммов были БЛРС+. Все штаммы КР были чувствительны к карбапенемам и амикацину. Внутрибольничные штаммы КР, выделенные у детей из «вспышки», в 100% были резистентны к цефалоспорином и АМС (БЛРС+), в 100% чувствительны к карбапенемам, аминогликозидам и FT. Внебольничные штаммы КР (n=50) были устойчивы к АМС (12%), к GN (6%), CIP (8%), FT (8%), к цефалоспорином (16 %), БЛРС+ (16%).

Суммарно внутрибольничные штаммы КР чаще проявляли устойчивость к цефалоспорином ($p < 0,01$), GN ($p < 0,05$), АМС ($p < 0,01$), SXT ($p > 0,01$), чем внебольничные. 57% внутрибольничных и 8% внебольничных штаммов КР были полирезистентными.

Клинико-лабораторная характеристика инфекции, вызванной «гипервирулентными» штаммами *Kl. pneumoniae* у детей. Ген *gmpA* обнаружен методом ПЦР у 23,5% штаммов КР (n=85), выделенных у детей в стационарных и амбулаторных условиях из различных биологических материалов (кровь, кал, моча и др.). Ген *gmpA* выявлен у штаммов КР, выделенных из фекалий (33,3%), мочи (25%), смывов со слизистой зева (15,7%). У штаммов КР, выделенных из крови (n=5), ЭТТ (n=6), ликвора (n=1) ген *gmpA* не обнаружен. У 60% детей, инфицированных *hVCR*, симптомы инфекции отсутствовали, у 15% - имелись проявления нетяжелой формы ИМП, у 25% детей – симптомы легкой и среднетяжелой ОКИ. *hVCR* чаще выделялись у детей с внебольничной (32%), чем у детей с внутрибольничной КИ (11,4%) ($p = 0,02$, OR= 3.647, ДИ 1.1- 12.1). *hVCR* выделены из фекалий у пациентов с кишечной инфекцией (31,2%) и у пациентов с бессимптомным носительством КР в ЖКТ (34,6%) ($p > 0,05$).

Внутрибольничная КИ, вызванная *hVCR*, проявлялась в форме носительства и ИМП (Таблица 2). Инвазивные формы (сепсис, пневмония, менингит) были вызваны только *gmpA*– штаммами. Внебольничная КИ, вызванная *hVCR*, проявлялась в форме ОКИ, носительства и ИМП. Все случаи КИ, вызванные *hVCR*, закончились выздоровлением.

Таблица 2 – Частота выделения *hV*KP при внутрибольничной и внебольничной КИ

Диагноз	Частота выделения <i>Kl. pneumoniae</i> (абс. ч.%)			
	Внутрибольничная КИ (n=35)		Внебольничная КИ (n=50)	
	<i>rmpA</i> ⁺ (<i>hV</i> KP)	<i>rmpA</i> [–]	<i>rmpA</i> ⁺ (<i>hV</i> KP)	<i>rmpA</i> [–]
Носительство (ЖКТ, ВДП)	3 (8,6%)	16(45,7%)	9(18%)	17(34%)
Кишечная инфекция	-	-	5(10%)	11(22%)
Сепсис неонатальный	0	5(14,3%)	-	-
Менингит, сепсис	0	1(2,9%)	-	-
Пневмония	0	6(17,1%)	-	-
ИМП	1 (2,8%)	3(8,6%)	2 (6%)	6(12%)

RmpA[–] штаммы чаще, чем *rmpA*⁺ (*hV*KP) были продуцентами БЛРС ($p<0,05$), обладали резистентностью к AMC ($p=0,01$), CAZ ($p=0,009$), FEP ($p=0,009$), CRO ($p=0,009$), SCF($p=0,009$), SXT ($p=0,02$) (Рисунок 1).

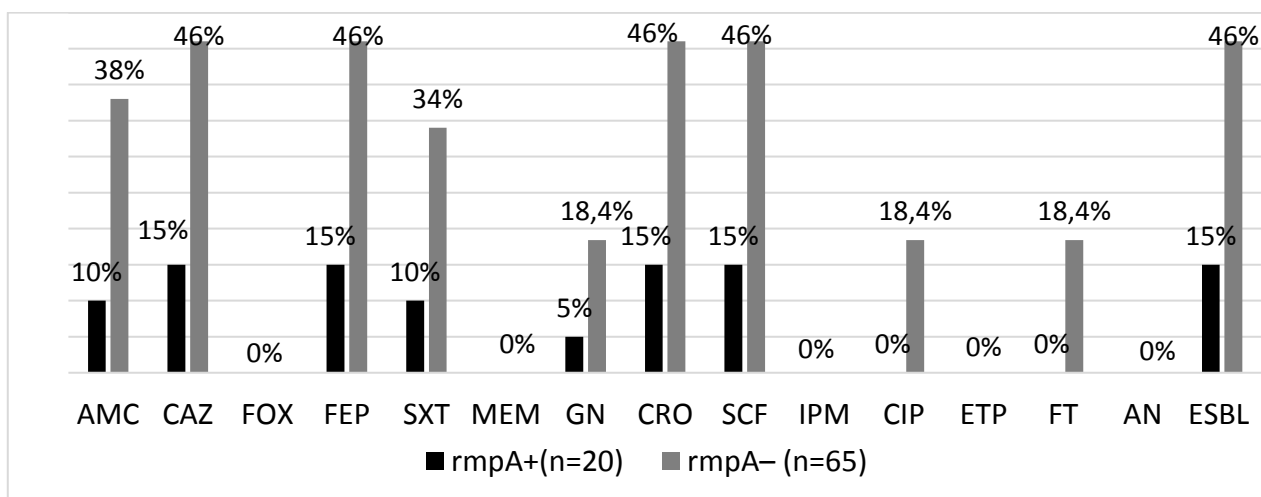


Рисунок 1 – Антибиотикорезистентность *rmpA*⁺ и *rmpA*[–] штаммов *Kl. pneumoniae*. *RmpA*[–] штаммы были значимо чаще полирезистентными, чем *rmpA*⁺ (*hV*KP) штаммы ($p=0,01$). 15% внутрибольничных штамма *rmpA*⁺ (*hV*KP) вырабатывали БЛРС и отнесены к MDR-*hV*KP. Все штаммы КР были чувствительны к карбапенемам и амикацину.

Диагностическая ценность стринг- теста для детекции *hV*KP. 21 штамм КР из 85 продемонстрировали положительный стринг-тест, т.е. клебсиеллы имели «гипермукоидный» фенотип. У 64 штаммов КР стринг-тест был отрицательным. По результатам ПЦР у 21 из 85 штаммов КР обнаружен ген *rmpA* (*rmpA*⁺), 64 штамма

КР данным геном не обладали (*gmpA*-). Рассчитана чувствительность (*Se*) и специфичность (*Sp*) стринг-теста для детекции *hνKP* (Таблица 3).

Таблица 3 – Чувствительность и специфичность стринг-теста для детекции *hνKP*

Стринг-тест	Особенность генома клебсиелл (абс. ч.)	
	<i>gmpA</i> + (n=20)	<i>gmpA</i> - (n=65)
Положительный	19 (95%)	2 (3%)
Отрицательный	1 (5%)	63 (97%)

Выявлено, что стринг-тест обладает высокой чувствительностью (*Se*=95%) и специфичностью (*Sp*=96,9%) и может быть использован для детекции «гипервирулентных» штаммов КР в клинической практике.

ВЫВОДЫ

1. Для здоровых детей раннего возраста характерна высокая частота кишечной колонизации клебсиеллами (60%). *Kl. pneumoniae* выделена из фекалий у 78,9% новорожденных, 71,7% ребёнка в возрасте 1-3 месяцев, 52,7- 55% детей в возрасте 4-12 месяцев, 42,1% детей в возрасте 13-36 месяцев.

2. При внутрибольничной вспышке клебсиеллёзной инфекции у новорожденных сепсис диагностирован в 73%, остеомиелит – в 7%, гнойный артрит – в 7%, вениткулит – в 7%, язвенно-некротический колит – в 7%, ДВС-синдром в 46% случаев. Перинатальными факторами риска развития нозокомиального клебсиеллёза являются недоношенность (*OR*=13,125 [1,3-126,3]) и искусственное вскармливание (*OR*=28 [3,9-196,4]). Внебольничная клебсиеллёзная инфекция у 50% грудных детей проявлялась среднетяжелыми формами поражения желудочно-кишечного тракта (гастроэнтерит, энтероколит) и ГВЗ (пиодермия – у 88%, омфалит - у 81%, гнойный конъюнктивит - у 25%).

3. У внебольничных штаммов *Kl. pneumoniae* чаще, чем у внутрибольничных выявлялся ген регулятора гипермукоидного фенотипа *gmpA* (32% и 11%, *p* <0,01) и ген адгезии *fimH* (36% и 14,2%, *p* <0,01). Внутрибольничные штаммы чаще (40%), чем внебольничные (22%) обладали геном хелатора железа *igr2* (*p* <0,05). Ген *plc*

выявлен у 12% внебольничных и 17,1% внутрибольничных штаммов клебсиелл ($p > 0,05$). Ген *clbB* обнаружен у 11,4% внутрибольничных и 6% внебольничных штаммов КР ($p > 0,05$) и чаще выявлялся у штаммов клебсиелл, выделенных из стерильных в норме локусов (17,4%), чем у штаммов, выделенных из кишечника и из зева (2,3%) ($p < 0,05$).

4. Нозокомиальные штаммы *Kl. pneumoniae* являлись продуцентами БЛРС и были резистентны к цефалоспорином (71%-100%), амоксициллин / клавуланату (60%-100%). Все нозокомиальные штаммы были чувствительны к карбапенемам (меронем, эртапенем, эмпипенем) и амикацину. 16% внебольничных штаммов были продуцентами БЛРС и были резистентны к цефалоспорином, 12% проявляли устойчивость к амоксициллин/клавуланату, 6% – к гентамицину, 8% – к сульфаметоксазол/триметаприму, цiproфлоксацину и нитрофурантоину.

5. «Гипервирулентные» штаммы КР чаще выявлялись у детей с внебольничной (32%), чем у детей с внутрибольничной инфекцией (11,4%) (OR 3,647; 95% ДИ 1,100—12,096). Инфекции, вызванные *hVCR*, проявлялись нетяжелыми формами кишечной инфекции (25%) и инфекции мочевых путей (15%), а также бессимптомным носительством микроба в зеве и в кишечнике (60%). 15 % «гипервирулентных» штаммов КР обладали множественной устойчивостью к антибиотикам.

6. Стринг-тест обладает высокой чувствительностью (Se 95%) и специфичностью (Sp 96,9%) и может быть использован для скрининговой диагностики «гипервирулентных» штаммов КР в клинической практике.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

1. Детям с внутрибольничной КИ, протекающей в тяжелой форме, рекомендуется эмпирическая антибактериальная терапия карбапенемами, при генерализованной форме показана комбинация карбапенемов с амикацином. Детям со среднетяжелой внебольничной КИ рекомендуется антибактериальная терапия нитрофурантоином, амоксициллин/клавуланатом или цефалоспорином 3 поколения.

2. С целью профилактики внутрибольничной клебсиеллёзной инфекции у новорожденных детей рекомендуется грудное вскармливание.

3. Для скрининга «гипервирулентных» штаммов *Kl. pneumoniae* рекомендуется проведение «стринг-теста».

4. Рекомендуется наблюдение за носителями «гипервирулентных» и/или мультирезистентных штаммов *Kl. pneumoniae* в течение 3-х месяцев. При повторном выделении возбудителя рекомендована фаготерапия по результатам чувствительности выделенного штамма.

5. Рекомендуется эпидемиологический надзор и инфекционный контроль за циркуляцией штаммов hνКР в детских стационарах с целью предотвращения распространения «гипервирулентных» мультирезистентных клонов *Kl. pneumoniae*.

ПЕРСПЕКТИВЫ ДАЛЬНЕЙШЕЙ РАЗРАБОТКИ ТЕМЫ

Перспективным является исследование по изучению влияния «гипервирулентных» штаммов клебсиелл на состояние здоровья детей в процессе длительного наблюдения, а также изучение состояния микробиома кишечника у детей с внутрибольничной и внебольничной клебсиеллёзной инфекцией для разработки стратегии пробиотической профилактики и терапии данных состояний.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Николаева И.В. Состав кишечной микрофлоры и фагорезистентность клебсиелл у детей с клебсиеллёзным дисбактериозом кишечника / И.В. Николаева Д.Р. Семенова, Н.Н. Скворцова // Инфекционные болезни у детей: материалы конференции в журнале «Журнал инфектологии». – 2012. – Т.4, №4. Приложение. – С.98-99.

2. Хаертынов Х. С. Клинико-эпидемиологические особенности кишечных инфекций, протекающих с синдромом гемоколита у детей / Х.С. Хаертынов, Д.Р. Семенова, К.В. Сушников // Казанский медицинский журнал – 2013. – Т. 94, №2. – С.208-211.

3. Николаева И. В. Распространенность генетических маркеров *rks*-острова у кишечных штаммов клебсиелл, выделенных у детей / И.В. Николаева, В.М. Бондаренко, Д.Р. Семенова // Вестник современной клинической медицины – 2013. – Т. 6, №3. – С.111.

4. Частота встречаемости *ivuC* и *pliC* генов ингибиторов лизоцима у клинических штаммов клебсиелл / С.В. Фиалкина, В.М., В.М. Бондаренко, Д.Р. Семенова и [др.] // Журнал микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии – 2014. – №4. – С. 3-7.

5. Семенова Д.Р. Характеристика кишечного микробиоценоза у детей с клебсиеллёзным дисбактериозом кишечника / Д.Р. Семенова, И.В. Николаева, Т.Ю. Павлова // Педиатрия и детская хирургия в Приволжском федеральном округе: материалы XI Российской конференции. – Казань: КГМУ, 2015. – С.43.

6. Шайхиева Г.С. Риск развития инфекционных заболеваний у детей раннего возраста, рожденных путем кесарева сечения / Г.С. Шайхиева, И.В. Николаева, Д.Р. Семенова // Материалы XIV конгресса детских инфекционистов России. – Москва: РНИМУ имени Н. И. Пирогова, 2015. – С. 46.

7. Клинико-лабораторная характеристика клебсиеллёзной инфекции у новорожденных детей / Д.Р. Семенова, И.В. Николаева, Ю. Р. Урманчеева [и др.] // Педиатрия и детская хирургия в Приволжском федеральном округе: материалы XI Российской конференции. – Казань: КГМУ, 2015. – С.69.

8. Шайхиева Г. С. Особенности течения неонатальных инфекций у детей, рожденных путем кесарева сечения / Г.С. Шайхиева, Д.Р. Семенова // Актуальные проблемы инфекционных болезней (вопросы эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения и профилактики): материалы юбилейной научно-практической конференции, посвященной 100-летию заведующего кафедрой инфекционных болезней КГМУ, профессора А.Е. Резника. – Казань: КГМУ, 2016. – С.55-56.

9. Семенова Д.Р. Характеристика клебсиеллёзной инфекции у новорожденных детей при спорадической и вспышечной заболеваемости / Д.Р. Семенова, Г.С. Шайхиева // Актуальные проблемы инфекционных болезней (вопросы

эпидемиологии, клиники, диагностики, лечения и профилактики): материалы юбилейной научно-практической конференции, посвященной 100-летию заведующего кафедрой инфекционных болезней КГМУ, профессора А.Е. Резника. – Казань: КГМУ, 2016. – С.41-42.

10.Шайхиева Г.С. Функциональные нарушения желудочно-кишечного тракта у детей, рожденных путем кесарева сечения / Г.С. Шайхиева, Д.Р. Семенова //90-я Всероссийская научно-практическая конференция студентов и молодых ученых: сборник тезисов. – Казань: КГМУ, 2016. – С. 115-116.

11.Нозокомиальная клебсиеллѐзная инфекция у новорожденных детей/ И.В. Николаева, В.А. Анохин, Д.Р. Семенова [и др.] // Практическая медицина. – 2016. – № 8(100). – С.23–28.

12.Клебсиеллѐзный неонатальный сепсис / Х.С. Хаертынов, В.А. Анохин, И.В. Николаева, Д.Р. Семенова [и др.] // Медицинский вестник Северного Кавказа – 2016. – Т.11, №1. – С. 82-86.

13.Семенова Д.Р. Клебсиеллѐзная неонатальная инфекция / Д.Р. Семенова, Н.Н. Скворцова, В.Т. Козлова // 90-я Всероссийская научно-практическая конференция студентов и молодых ученых: сборник тезисов. – Казань: КГМУ, 2016.– С. 116.

14.Клебсиеллѐзный неонатальный сепсис/ А. Д. Царегородцев, Х. С. Хаертынов, Д.Р. Семенова [и др.]// Российский вестник перинатологии и педиатрии – 2016. – №4. – С.49-54.

15.Особенности течения инфекционных заболеваний неонатального периода у детей, рожденных путем кесарева сечения / Г.С. Шайхиева, И.В. Николаева, Д.Р. Семенова [и др.] // Педиатрия и детская хирургия в Приволжском федеральном округе: материалы XI Российской конференции. – Казань: КГМУ, 2017. – С. 41.

16.Клебсиеллѐзная инфекция у новорожденных детей/Д.Р. Семенова, Г.С. Шайхиева, Ю.Р. Урманчеева [и др.] // Педиатрия и детская хирургия в Приволжском федеральном округе: материалы XI Российской конференции. – Казань: КГМУ, 2017. – С. 33.

17.Семенова Д.Р. Генетические маркеры патогенности и антибиотикорезистентности штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у новорождённых с различной патологией / Д.Р. Семенова, Г.С. Шайхиева // 91-ая Всероссийская научно-практическая конференция студентов и молодых ученых: сб. тез. – Казань, 2017. – С. 168–169.

18.Характеристика спорадических случаев клебсиеллёзной инфекции у новорожденных / Г.С. Шайхиева, Т.Ю. Павлова, Д.Р. Семенова [и др.] // Материалы ежегодного Всероссийского конгресса по инфекционным болезням с международным участием. – Казань: КГМУ, 2017. – С.256.

19.Шайхиева Г.С. Особенности течения острых кишечных инфекций у детей, рожденных путем кесарева/ Г.С. Шайхиева, Д.Р. Семенова // 91-я Всероссийская научно-практическая конференция студентов и молодых ученых: сборник тезисов. – Казань: КГМУ, 2017. – С. 169.

20.Детекция гена колибактина у штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных у новорожденных и детей грудного возраста / И.В. Николаева, Д.Р. Семенова, Г.С. Шайхиева [и др.] // Материалы V Международной научно-практической конференции «Современные биотехнологии для науки и практики», приуроченной к Международному Дню ДНК-2018. – Санкт-Петербург, 2018. – С. 28–29.

21. Case of Meningitis in a Neonate Caused by an Extended-Spectrum-Beta-Lactamase-Producing Strain of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* / H.S. Khaertynov, V.A. Anokhin, D.R. Semenova [et al.] // Front. Microbiol. – 2017. – URL: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01576>.

22.Клинико-эпидемиологические особенности и предикторы летальности при неонатальном сепсисе / Х.С. Хаертынов, И.В. Николаева, Д.Р. Семенова [и др.] // Инфекционные болезни. –2017. – Т.15, №14. – С.13-19.

23.Детекция генов гипервирулентности у штаммов *Klebsiella pneumoniae*, выделенных из различных локусов у детей грудного возраста / И.В. Николаева, Д.Р. Семенова, Г.С. Шайхиева [и др.] // Материалы Всероссийской заочной научно-практической конференции с международным участием «Микробиология в современной медицине». – Казань, 2017. – С. 60–61.

24.Шайхиева Г.С. Метаболическая активность кишечной микрофлоры у новорожденных в зависимости от способа родоразрешения / Г.С. Шайхиева, И.В. Николаева, Д.Р. Семенова // Материалы X Ежегодного Всероссийского Конгресса по инфекционным болезням с международным участием. – Москва, 2018. – С.158.

25.Virulence Factors and Antibiotic Resistance of *Klebsiella pneumoniae* Strains Isolated From Neonates With Sepsis / H.S. Khaertynov, V.A. Anokhin, D.R. Semenova [et al.] // Front. Med. – 2018. – URL: <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00225>.

26.Частота колонизации «гипервирулентными» штаммами *Klebsiella pneumoniae* новорожденных и грудных детей с внебольничной и нозокомиальной клебсиеллёзной инфекцией / Д.Р. Семенова, И.В. Николаева, С. В. Фиалкина [и др.] // Российский вестник перинатологии и педиатрии. – 2020. – Т.65, №5 – С.158-163.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

БЛРС	β-лактамазы расширенного спектра
ВДП	верхние дыхательные пути
ВКИ	внебольничная клебсиеллёзная инфекция
ГАУЗ «ДРКБ МЗ РТ»	ГАУЗ Детская Республиканская клиническая больница
ГАУЗ «РКИБ»	ГАУЗ Республиканская клиническая инфекционная больница
ГВЗ	гнойно-воспалительное заболевание
ЖКТ	желудочно-кишечный тракт
ИМП	инфекция мочевых путей
КИ	клебсиеллёзная инфекция
Me	медиана
НКИ	нозокомиальная клебсиеллёзная инфекция
НЭК	некротизирующий энтероколит
ОКИ	острая кишечная инфекция

ПЦР	полимеразная цепная реакция
ЭТТ	эндотрахеальная трубка
АМС	ампициллин/клавуланат
clbB	колибактин
CIP	ципрофлоксацин
CRO	цефтриаксон
ETP	эртапенем
FT	нитрофурантоин
fimH	фимбрии 1 типа
FEP	цефепим
GN	гентамицин
hvKP	«гипервирулентный» штамм <i>Kl. pneumoniae</i>
IPM	имипенем
KP	<i>Kl. pneumoniae</i>
MDR	мультирезистентность
MEM	меронем
OR	отношение шансов
PliC	антилизозимный фактор
rmp A	ген регулятор мукоидного фенотипа
SCF	цефоперазон
SXT	сульфаметоксазол/триметоприм
Ybt	иерсинебактин