

## Вирулентность и антибиотикорезистентность изолятов *Klebsiella pneumoniae* у новорожденных с локализованными и генерализованными формами клебсиеллезной инфекции

Х.С. Хаертынов<sup>1</sup>, В.А. Анохин<sup>1</sup>, А.А. Ризванов<sup>2</sup>, Ю.Н. Давидюк<sup>2</sup>, С.В. Халиуллина<sup>1</sup>, С.А. Любин<sup>3</sup>, Ф.М. Казакова<sup>4</sup>, М.А. Сатрутдинов<sup>4</sup>, М.Г. Фаттахов<sup>5</sup>

<sup>1</sup>ФГБОУ ВО «Казанский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, г. Казань, Россия;

<sup>2</sup>ФГАОУВО Казанский (Приволжский) федеральный университет Министерства образования РФ, г. Казань, Россия;

<sup>3</sup>ГАУЗ Городская детская больница № 1, г. Казань, Россия;

<sup>4</sup>ГАУЗ Детская республиканская клиническая больница, г. Казань, Россия; <sup>5</sup>ГАУЗ Республиканская клиническая больница, г. Казань, Россия

## Virulence and Antibiotic Resistance of Isolates of *Klebsiella Pneumoniae* in Newborns With Localized and Generalized Forms of Infection

Kh.S. Khaertynov<sup>1</sup>, V.A. Anohin<sup>1</sup>, A.A. Rizvanov<sup>2</sup>, Yu.N. Davidiyuk<sup>2</sup>, S.V. Khaliullina<sup>1</sup>, S.A. Lyubin<sup>3</sup>, F.M. Kazakova<sup>4</sup>, M.A. Satrutdinov<sup>4</sup>, M.G. Fattahov<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Kazan State Medical University, Kazan, Russia;

<sup>2</sup>Kazan (Privolzhsky) Federal University, Kazan, Russia;

<sup>3</sup>City Children's Hospital No. 1, Kazan, Russia;

<sup>4</sup>Children's Republican Clinical Hospital, Kazan, Russia;

<sup>5</sup>Republican Clinical Hospital, Kazan, Russia

**Цель:** изучение влияния вирулентности и чувствительности к антибиотикам *K. pneumoniae* на течение и исход локализованных и генерализованных форм инфекции у новорожденных.

Проведено исследование 25 изолятов *K. pneumoniae*, выделенных из крови (12 изолятов) и кала (13 изолятов) детей с различными формами неонатальной инфекции. Первую группу составили 12 детей с бактериологически доказанным неонатальным сепсисом, из крови которых была выделена *K. pneumoniae*. Во вторую группу вошли 13 детей с локализованной бактериальной инфекцией, протекавшей в форме пневмонии, у которых *K. pneumoniae* была выделена из кала. Методом полимеразной цепной реакции проведено определение факторов вирулентности изолятов *K. pneumoniae* – *rmpA*, аэробактина и колибактина. Определение чувствительности *K. pneumoniae* к антибиотикам проводилось методом Kirby–Bauer. Для выявления способности *K. pneumoniae* продуцировать β-лактамазы расширенного спектра действия (БЛРС) был использован метод двойных дисков.

**Результаты.** В первой группе у 8 из 12 детей изоляты *K. pneumoniae* продуцировали БЛРС. Бактерии были чувствительны к меропенему, амикацину, в 4 случаях – к ципрофлоксацину. У одного ребенка отмечалась устойчивость бактерий к меропенему. Остальные 4 изолята были чувствительны к цефалоспорином 3-го поколения, защищенным аминопенициллинам, амикацину, меропенему и ципрофлоксацину. Ген *rmpA* был выявлен в изолятах *K. pneumoniae* у 6 детей. Исследование этих колоний *K. pneumoniae* дало во всех случаях положительный результат на «стринг-тест». У 3 изолятов выявлены гены сидерофоров, аэробактина и колибактина. Аэробактин и колибактин продуцировали только штаммы, несущие ген *rmpA*.

Во второй группе детей БЛРС продуцировали 3 изолята *K. pneumoniae* (23%). Ген *rmpA* был обнаружен в 8 из 13 случаев, гены аэробактина и колибактина – в 11 и 7 соответственно. «Стринг-тест» был положительным в 8 случаях, это были только *rmpA*-позитивные бактерии. Сидерофоры выявлялись как у *rmpA*-позитивных, так у *rmpA*-негативных изолятов. У 2 детей микробы продуцировали БЛРС и были *rmpA*-позитивными. В одном случае изоляты не имели ни характерных факторов вирулентности, ни БЛРС.

**Заключение.** Риск развития локализованных и генерализованных форм неонатальной клебсиеллезной инфекции в значительной мере определяется микробиологическими особенностями микроорганизма, его резистентностью и вирулентностью. Мы наблюдали клинические варианты заболевания, вызванные *K. pneumoniae*, обладающие одновременно двумя свойствами – высокой агрессивностью и устойчивостью к антибактериальной терапии.

**Ключевые слова:** дети, неонатальный сепсис, *Klebsiella pneumoniae*, вирулентность, антибиотикорезистентность.

**Для цитирования:** Хаертынов Х.С., Анохин В.А., Ризванов А.А., Давидюк Ю.Н., Халиуллина С.В., Любин С.А., Казакова Ф.М., Сатрутдинов М.А., Фаттахов М.Г. Вирулентность и антибиотикорезистентность изолятов *Klebsiella pneumoniae* у новорожденных с локализованными и генерализованными формами клебсиеллезной инфекции. Рос вестн перинатол и педиатр 2018; 63:(5): 139–146. DOI: 10.21508/1027-4065-2018-63-5-139-146

**Objective.** To study the effect of virulence and antibiotic sensitivity of *K. pneumoniae* on the course and outcome of localized and generalized forms of infection in newborns.

The authors studied 25 samples of *K. pneumoniae* isolated from the blood (12 isolates) and feces (13 isolates) of the children with various forms of neonatal infection. Group 1 consisted of 12 children with bacteriologically proven neonatal sepsis, *K. pneumoniae* was isolated of their blood. Group 2 included 13 children with localized bacterial infection in the form of pneumonia, *K. pneumoniae* was isolated from their feces. The PCR method was used to determine the virulence factors of the isolates of *K. pneumoniae*–*rmpA*, aerobactin and colibactin. The sensitivity of *K. pneumoniae* to antibiotics was determined by the Kirby–Bauer method. The double disk method was used to determine the ability of *K. pneumoniae* to produce extended-spectrum β-lactamases (ESBL).

**Results.** In Group 1 the isolates of *K. pneumoniae* produced ESBL in 8 children out of 12. The bacteria were sensitive to meropenem, amikacin and ciprofloxacin in 4 cases. One child demonstrated resistance to meropenem. The remaining 4 isolates were sensitive

to the third-generation cephalosporins protected by aminopenicillins, amikacin, meropenem and ciprofloxacin. The *rmpA* gene was determined in the *K. pneumoniae* isolates in 6 children. The “string-test” of these colonies of *K. pneumoniae* in all cases gave a positive result. The genes of siderophores, aerobactin and colibactin were found in 3 isolates. Aerobactin and colibactin produced only *rmpA*-bearing strains.

3 isolates (23%) of *K. pneumoniae* produced ESBL in Group 2. In 8 out of 13 cases there was *rmpA*-gene and genes of aerobactin and colibactin in 11 and 7 cases accordingly. The “string-test” was positive in 8 cases, and there were only *rmpA*-positive bacteria. Siderophores were detected both in *rmpA*-positive and *rmpA*-negative isolates. The microbes produced BLBR and were *rmpA*-positive in 2 children. In one case, the isolates had neither the characteristic virulence factors, nor BLBR.

**Conclusion.** The risk of developing localized and generalized forms of neonatal klebsiella infection is largely determined by microbiological features of the microorganism, its resistance and virulence. We observed clinical variants of the disease caused by *K. pneumoniae*, which simultaneously had two properties: high aggressiveness and resistance to antibiotic therapy.

**Key words:** children, neonatal sepsis, *Klebsiella pneumoniae*, virulence, antibiotic resistance

**For citation:** Khaertynov Kh.S., Anohin V.A., Rizvanov A.A., Davidyuk Yu.N., Khaliullina S.V., Lyubin S.A., Kazakova F.M., Satrutdinov M.A., Fattahov M.G. Virulence and Antibiotic Resistance of Isolates of *Klebsiella Pneumoniae* in Newborns With Localized and Generalized Forms of Infection. *Ros Vestn Perinatol i Peditr* 2018; 63:(5): 140–146 (in Russ). DOI: 10.21508/1027-4065-2018-63-5-140-146

**Н**eonатальный сепсис — актуальная инфекционная патология новорожденных, характеризующаяся как тяжестью клинических проявлений, так и высокой летальностью [1, 2]. Как известно, недоношенность и незрелость факторов врожденного и адаптивного иммунитета являются основными причинами сепсиса у новорожденных. Однако существенное влияние на течение и исход заболевания оказывают микробиологические и генетические особенности возбудителя — его вирулентность и антибиотикорезистентность. С антибиотикорезистентностью в первую очередь ассоциируется неэффективность антибактериальной терапии, а отсюда — и риск неблагоприятного исхода [1, 3].

В этом контексте особый интерес представляет группа так называемых супербактерий, включающая ванкомицинрезистентные штаммы *Enterococcus faecium*, метициллинрезистентные *Staphylococcus aureus* (MRSA), штаммы *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumani*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter species*, продуцирующие β-лактамазы расширенного

спектра действия (БЛРС) [3]. Аббревиатура ES-КАРЕ (по первым буквам видов перечисленных выше бактерий), омофоничная английскому Escare, напрямую указывает на проблемы современной антибиотикотерапии.

*K. pneumoniae* — признанная причина неонатального сепсиса [4, 5]. Частота клебсиеллезного сепсиса в структуре неонатального сепсиса в развитых странах колеблется от 4 до 9%, а в развивающихся равна уже 16–28% [6]. При этом наличие у клебсиелл БЛРС — один из важных (и очень часто необходимых) компонентов «инфекционного госпитализма» [7–9].

Другой значимый фактор, влияющий на течение и исход сепсиса, — вирулентность *K. pneumoniae*. К их числу относят адгезины (фимбрии 1-го и 3-го типов), капсульный антиген, липополисахарид, сидерофоры [10, 11]. В 80–90-е годы прошлого века на Тайване были идентифицированы так называемые гипервирулентные штаммы *K. pneumoniae* (hv-КР), которые вызывали тяжелые инвазивные формы инфекции в виде абсцессов печени, менингита, эндофтальмита у ранее здоровых взрослых пациентов [12–14]. Высокую вирулентность этих штаммов связывают с выработкой регулятора мукоидного фенотипа (*gmpA*) [15]. В настоящее время случаи клебсиеллезной инфекции, вызванной hv-КР, регистрируют по всему миру [16, 17]. При этом, как показывает практика, наибольшую опасность представляют случаи, связанные с гипервирулентными штаммами, способными одновременно продуцировать и БЛРС [18, 19]. Именно такое сочетание гипервирулентности с множественной лекарственной устойчивостью штаммов *K. pneumoniae* представляет колоссальную опасность для пациентов.

**Цель исследования:** изучение влияния вирулентности и чувствительности к антибиотикам *K. pneumoniae* на течение и исход локализованных и генерализованных форм инфекции у новорожденных.

#### Характеристика детей и методы исследования

Исследование проведено в период с 2015 по 2018 г. Изучались 25 изолятов *K. pneumoniae*, выделенных из крови (12 изолятов) и кала (13 изолятов) детей с различными формами неонатальной инфекции. Все

© Коллектив авторов, 2018

Адрес для корреспонденции: Хаертынов Халил Саубанович — к.м.н., доц. кафедры детских инфекций КГМУ, ORCID: 0000-0002-9013-4402

Анохин Владимир Алексеевич — д.м.н., проф., зав. кафедрой детских инфекций КГМУ, ORCID: 0000-0003-1050-9081

Халиуллина Светлана Викторовна — д.м.н., доц. кафедры детских инфекций КГМУ

420012 Казань, ул. Бултерова, д. 49

Ризванов Альберт Анатольевич — д.б.н., проф. кафедры генетики Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) Федерального университета, ORCID: 0000-0002-9427-5739

Давидюк Юрий Николаевич — ст. научн. сотр. Open Lab «Генные и клеточные технологии» Института фундаментальной медицины и биологии Казанского (Приволжского) Федерального университета, ORCID: 0000-0003-1537-3099

420021 Казань, ул. Парижской коммуны, д. 9

Любин Сергей Анатольевич — зав. отделением реанимации новорожденных городской детской больницы № 1, ORCID: 0000-0002-1322-2601

420034 Казань, ул. Декабристов, д. 125а

Казакова Фатима Мусаевна — зав. отделением патологии новорожденных Детской республиканской клинической больницы

Сатрутдинов Марат Альбертович — зав. отделением реанимации новорожденных Детской республиканской клинической больницы

420138 Казань, ул. Оренбургский тракт, д. 140

Фаттахов Марат Гильмыханович — зав. отделением реанимации новорожденных Перинатального Центра Республиканской клинической больницы

420064 Казань, ул. Оренбургский тракт, д. 138

пациенты были разделены на две группы. Первую группу составили 12 детей с бактериологически доказанным неонатальным сепсисом, из крови которых была выделена *K. pneumoniae*. Критерии диагностики сепсиса включали наличие одного или нескольких очагов инфекции, развитие синдрома системного воспалительного ответа с высоким уровнем (выше 1,5 мг/дл) С-реактивного белка. У 4 детей диагностирован ранний неонатальный сепсис, у 8 — поздний. Всем детям проводилось комплексное лечение, включавшее антибиотики, инфузионную терапию, искусственную вентиляцию легких (ИВЛ) различной продолжительности и внутривенное введение иммуноглобулинов. Эмпирическая антибиотикотерапия в подобных случаях осуществлялась амоксициклавом, а после выделения из крови *K. pneumoniae* корректировалась по результатам антибиотикочувствительности. Во вторую группу вошли 13 детей с локализованной бактериальной инфекцией, протекавшей в форме пневмонии, у которых *K. pneumoniae* была выделена из кала. У 5 детей пневмония развилась на фоне аспирационного синдрома. У 2 детей *K. pneumoniae* была выделена из ротоглотки.

**Определение С-реактивного белка.** Количественное определение СРБ в крови проводилось иммунотурбидиметрическим методом [20] на анализаторе «CobasIntegra 800» с использованием набора реагентов компании «Roche» (Швейцария) согласно инструкции производителя.

**Выделение изолятов *K. pneumoniae*:** 1 мл крови больных забирали стерильным шприцем, смешивали с 20 мл бульона из мозгасердца (CondaPronadisa, Испания) и инкубировали при 37°C в течение 7 дней, затем проводили посев на поверхность кровяного агара, агара MacConkey (Oxoid, Великобритания) и инкубировали при 37°C в течение 24 часов [21]. Для выделения *K. pneumoniae* из ликвора был использован шоколадный агар (Oxoid, Великобритания). Изоляты бактерий были идентифицированы морфологически и на основании биохимических тестов (окраска по Граму, тесты на подвижность, продукцию индола и уреазный тест).

**Тест на гипервирулентность.** Колонии *K. pneumoniae*, выделенные при культивировании на кровяном агаре и агаре MacConkey (Oxoid, Великобритания), были тестированы на способность формировать мукоидную нить. Стандартной микробиологической петлей касались поверхности колоний *K. pneumoniae*, затем петлю медленно поднимали. Формирование мукоидной нити более 5 мм в длину указывало на гипервирулентный фенотип микроорганизма.

**Определение факторов вирулентности *K. pneumoniae*.** Методом полимеразной цепной реакции (ПЦР) проведено определение генов *rtxA*, аэробактина и колибактина.

**Определение чувствительности *K. pneumoniae* к антибиотикам.** Тестирование на чувствительность

*K. pneumoniae* к антибиотикам осуществлялось методом Kirby–Baueг, согласно протоколу клинических лабораторных стандартов (CLSI) [22]. Для определения способности *K. pneumoniae* продуцировать БЛРС использован метод двойных дисков согласно протоколу CLSI [22].

**Выделение ДНК.** Несколько колоний *K. pneumoniae*, взятых с поверхности агара MacConkey, смешивали с 50 мкл дистиллированной воды. ДНК бактерий выделяли, используя набор реактивов («Litech», Россия), согласно инструкции производителя.

**ПЦР-детекция генов факторов вирулентности.** Образцы ДНК проанализированы методом ПЦР. Праймеры сиквенсов, использованные для амплификации фрагментов генов, представлены в табл. 1.

Комитет по этике Казанского государственного медицинского университета одобрил это исследование, от родителей детей было получено письменное информированное согласие в соответствии с принципами, утвержденными настоящим протоколом (Федеральный закон N323-ФЗ от 21.11.2011 г. «О защите здоровья граждан в Российской Федерации»).

## Результаты

Установлено, что неонатальный сепсис в 6 из 12 случаев развился у недоношенных детей, трое из которых родились с очень низкой массой тела. При этом 7 из 12 детей родились путем кесарева сечения. В 4 случаях выявлены материнские факторы риска инфицирования новорожденных: у 3 женщин во время беременности диагностирован кольпит, у одной — хронический пиелонефрит. Очаги инфекции были установлены у 8 детей. У 3 пациентов сепсис протекал в форме гнойного менингита, у 3 — в виде некротического энтероколита, у 2 — в виде пневмонии и энтероколита. В 4 случаях имела место септицемия. У 3 детей (двое с гнойным менингитом, один — с некротическим энтероколитом, осложнившимся разлитым перитонитом) наступил летальный исход. Подробная характеристика пациентов представлена в табл. 2.

У 8 из 12 детей изоляты *K. pneumoniae* продуцировали БЛРС. Бактерии были резистентны ко всем аминопеницилинам (защищенным и незащищенным), цефалоспорином 3-го поколения, гентамицину, в 4 случаях — к ципрофлоксацину. Эти же микробы были чувствительны к меропенему и амикацину (табл. 3). У одного ребенка отмечалась устойчивость бактерий и к меропенему. Остальные 4 изолята были устойчивы только к незащищенным аминопеницилинам, но чувствительны к цефалоспорином 3-го поколения, защищенным аминопеницилинам, амикацину, меропенему и ципрофлоксацину.

При изучении вирулентности микроорганизма ген *rtxA* был выявлен у *K. pneumoniae* в 6 из 12 случаев неонатального сепсиса. В 3 случаях этот ген обнаружен у микробов, выделенных от детей с гнойным

Таблица 1. Праймеры, использованные для ПЦР  
Table 1. Primers used for PCR

Ген	Праймеры секвенсов (5' → 3')	Размер ПЦР-продукта, п.н.	Ссылки на литературу
<i>rmpA</i>	Forward (ACGACTTTCAAGAGAAATGA)	418	[23]
	Reverse (CATAGATGTCATAATCACAC)		
<i>rmpA</i>	Forward (CATAAGAGTATTGGTTGACAG)	462	[24]
	Reverse (CTTGCATGAGCCATCTTTCA)		
<i>iroD</i>	Forward (GCATAGGCGGATACGAACAT)	531	[23]
	Reverse (CACAGGGCAATTGCTTACCT)		
<i>iroN</i>	Forward (CTGTCCGGCATCGGTTTTATT)	556	[25]
	Reverse (TGCCGTGTCGATTATTACCA)		
<i>clbA</i>	Forward (ATGAGGATTGATATATTAATTGGAC)	579	[26]
	Reverse (ATTCTGCCCATTTGACGAATG)		
<i>clbB</i>	Forward (GATTTGGATACTGGCCGATAACCG)	732	[26]
	Reverse (CCATTTCCCCTTTGACACAC)		

Таблица 2. Клинико-лабораторная характеристика пациентов (Me; межквартильный размах)  
Table 2. Clinical and laboratory characteristics of patients (Me; interquartile range)

Параметры	Группа новорожденных		p
	сепсис, n=12	пневмония, n=13	
Гестационный возраст, нед	36,5 [31,5–39]	35 [32–39]	0,9
Масса при рождении, г	2600 [1575–3285]	2500 [1900–2890]	0,9
Пол (мальчики), абс (%)	7 (58)	8 (62)	
Родоразрешение: кесарево сечение, абс (%)	7 (58)	7 (54)	
Оценка по шкале Апгар, баллы	7 [5,5–7,5]	7 [7–8]	0,15
Клиническая форма, абс (%):			
менингит	3 (35)		
пневмония	0	13 (100)	
пневмония и энтероколит	2 (17)		
некротический энтероколит	3 (25)		
септицемия	4 (33)		
C-реактивный белок, мг/дл	3,6 [0,9–9,8]	0,2 [0,1–0,4]	0,002
Лейкоциты в крови ·10 <sup>9</sup> /л	17,7 [4,7–21,6]	11,7 [8,3–13,2]	0,3
Тромбоциты в крови ·10 <sup>9</sup> /л	38,5 [14,5–48,5]	212 [204–291]	0,0002
Умерли, абс (%)	3 (25)	0	

менингитом, в 2 случаях – при септицемии и в одном – от пациента с некротическим энтероколитом. Исследование колоний *K. pneumoniae*, обнаруживших наличие гена *rmpA*, дало положительный результат на «стринг-тест».

У 3 изолятов выявлены гены сидерофоров аэробактерии и колибактерии (табл. 4). Аэробактерин и колибактерин продуцировали только штаммы, несущие ген *rmpA*. Три *rmpA*-положительных изолята *K. pneumoniae* не продуцировали ни аэробактерин, ни колибактерин. У 2 из 3 погибших детей изоляты бактерий содержали гены *rmpA*, аэробактерина и колибактерина. Это были доношенные дети с поздним началом неонатального

сепсиса, протекавшего в форме гнойного менингита, осложнившегося отеком-набуханием головного мозга. Следует отметить, что эти же микробы продуцировали БЛРС. Третий случай летального исхода был связан с низковирулентным штаммом *K. pneumoniae* (*rmpA*-отрицательным), но продуцирующим БЛРС. Это был недоношенный ребенок, родившийся с очень низкой массой тела, у которого в последующем развился некротический энтероколит, осложнившийся разлитым перитонитом.

В группе новорожденных с пневмонией (вторая группа) недоношенными родились 7 из 13 детей, из них двое – с очень низкой массой тела, 7 родились

Таблица 3. Результаты антибиотикочувствительности изолятов *K.pneumoniae* у новорожденных с сепсисом и локализованной бактериальной инфекцией, абс (%)Table 3. Antibiotic susceptibility of *K.pneumoniae* isolates in neonates with sepsis and with localized bacterial infection, abs (%)

Антибиотик (содержание в диске, мкг)	Группа новорожденных			
	сепсис, n=12		пневмония, n=13	
	чувствителен	устойчив	чувствителен	устойчив
Ампициллин (25)	0	12(100)	0	13 (100)
Ампициллин/клавуланат (30)	5 (42)	7 (58)	10 (77)	3 (23)
Цефтазидим (30)	5 (42)	7 (58)	10 (77)	3 (23)
Цефотаксим (30)	5 (42)	7 (58)	10 (77)	3 (23)
Цефтриаксон (30)	5 (42)	7 (58)	10 (77)	3 (23)
Цефепим (30)	5 (42)	7 (58)	10 (77)	3 (23)
Ципрофлоксацин (5)	8 (67)	4 (33)	10 (77)	3 (23)
Меропенем (10)	11 (92)	1 (8)	10 (77)	0
Амикацин (30)	12 (100)	0	10 (77)	0

путем кесарева сечения. Во всех случаях заболевание завершилось выздоровлением. В 6 случаях выявлены материнские факторы риска инфицирования новорожденных: у 2 матерей отмечался длительный безводный период (более 18 ч), в 2 случаях околоплодные воды были мекониальными, еще у 2 женщин во время беременности был диагностирован кольпит.

В этой группе детей БЛРС продуцировали 3 из 13 изолятов. Ген *rtxA* обнаружен в 8 случаях, гены аэробактерии и колибактерии – у 11 и 7 изолятов соответственно. «Стринг-тест» был положительным в 8 случаях. Это были только *rtxA*-позитивные бактерии. Сидерофоры выявлялись как у *rtxA*-позитивных, так и у *rtxA*-негативных изолятов (см. табл. 4). У 2 детей микробы продуцировали БЛРС и были *rtxA*-позитивными. В одном случае изоляты не имели ни характерных факторов вирулентности, ни БЛРС.

Сравнительная оценка частоты выделения бета-лактамаз расширенного спектра действия и фактора вирулентности – гена *rtxA* показало, что риск неонатального сепсиса ассоциирован в первую очередь с продукцией БЛРС (OR=6,8; ДИ 3,6–12,7;  $p<0,001$ ), а не с наличием у микроба гена *rtxA* (OR=0,6; ДИ 0,3–1,1;  $p=0,1$ ).

### Обсуждение

Антибиотикорезистентность бактерий – одна из основных причин неэффективности терапии при нозокомиальных инфекциях и сепсисе. Всемирная организация здравоохранения в 2017 г. обозначила *K. pneumoniae*, продуцирующие БЛРС, как одну из наиболее опасных супербактерий, включив ее вместе с *Acinetobacter baumannii* и *Pseudomonas aeruginosa* по степени опасности в группу бактерий наивысшего приоритета [27]. Новорожденные дети для таких бактерий – наиболее уязвимые пациенты. Как известно, риск тяжелой неонатальной инфекции (сепсиса, пневмонии) ассоциируется с низким гестационным возрастом, малой массой

тела при рождении, а также длительным нахождением в отделениях интенсивной терапии [28, 29]. В нашем исследовании в группе детей с неонатальным сепсисом недоношенные составили 45%\*, в группе детей с пневмонией – 54%. Изоляты *K. pneumoniae* продуценты БЛРС у детей с сепсисом, выявлены в 67% случаев, в группе детей с пневмонией – в 23%.

Оценка антибиотикочувствительности показала, что БЛРС-продуцирующие изоляты *K. pneumoniae* в обеих группах были чувствительны к меропенему и амикацину. Только у одного ребенка микробы, выделенные из крови, были устойчивы к меропенему, что, вероятно, было связано с продукцией ими карбапенемаз. Очевидно, что в случаях развития доказанного или предполагаемого неонатального сепсиса, обусловленного БЛРС-продуцирующими штаммами бактерий семейства *Enterobacteriaceae*, меропенем и амикацин должны рассматриваться в качестве средств приоритетной антибактериальной терапии. Раннее введение антибиотиков, как известно, является одним из важных условий эффективной терапии сепсиса, поскольку задержка с ее началом может существенно повлиять на исход заболевания [30]. Однако клинические и лабораторные признаки неонатального сепсиса, в том числе клебсиеллезного, часто неспецифичны, а потому ранняя диагностика нередко бывает затруднительной. Из лабораторных признаков неонатального сепсиса, ассоциируемых с грамотрицательными бактериями, ряд исследователей указывает на частое развитие тромбоцитопении [31]. В нашем исследовании тромбоцитопения наблюдалась у 11 из 12 детей с сепсисом, тогда как в группе детей с пневмонией количество тромбоцитов оставалось в пределах нормальных значений на протяжении всего периода заболевания.

\* Здесь и далее % вычислен условно, т.к. количество детей меньше 100.

Таблица 4. Факторы вирулентности изолятов *K.pneumoniae* у новорожденных с сепсисом и локализованной бактериальной инфекциейTable 4. Virulence factors of *K.pneumoniae* isolates in neonates with sepsis and with localized bacterial infection

Очаг инфекции	Исход заболевания	БЛРС	<i>rmpA</i>	Аэробактин		Колибактин	
				<i>iro D</i>	<i>iro N</i>	<i>clb A</i>	<i>clb B</i>
<b>Дети с неонатальным сепсисом (n=12)</b>							
Менингит	Выздоровление	–	+	–	–	–	–
Менингит	Летальный	+	+	+	+	+	+
Менингит	Летальный	+	+	+	+	+	–
Энтероколит	Выздоровление	–	+	–	–	–	–
Энтероколит	Выздоровление	+	–	–	–	–	–
Энтероколит + Пневмония	Выздоровление	+	–	–	–	–	–
Энтероколит + Пневмония	Выздоровление	+	–	–	–	–	–
Септицемия	Выздоровление	–	–	–	–	–	–
Септицемия	Выздоровление	–	–	–	–	–	–
Септицемия	Выздоровление	+	+	+	+	–	+
Энтероколит	Летальный	+	–	–	–	–	–
Септицемия	Выздоровление	+	+	–	–	–	–
<b>Новорожденные с пневмонией (n=13)</b>							
Пневмония	Выздоровление	–	–	–	–	–	–
Пневмония	Выздоровление	+	+	+	+	–	–
Пневмония	Выздоровление	–	+	+	+	+	+
Пневмония	Выздоровление	–	–	+	+	–	–
Пневмония	Выздоровление	–	–	+	+	–	+
Пневмония	Выздоровление	–	+	+	+	–	+
Пневмония	Выздоровление	–	–	+	+	–	–
Пневмония	Выздоровление	–	+	+	+	–	+
Пневмония	Выздоровление	–	+	+	+	–	+
Пневмония	Выздоровление	+	–	–	–	–	–
Пневмония	Выздоровление	+	+	+	+	–	+
Пневмония	Выздоровление	–	+	+	+	–	+
Пневмония	Выздоровление	–	+	+	+	–	–

Несмотря на известную роль БЛРС в развитии неонатального сепсиса, очевидно, что меньшая (а возможно, даже и решающая) принадлежит факторам вирулентности *K. pneumoniae* – капсульному полисахариду, липополисахариду, адгезинам и сидерофорам [10, 11]. Обнаружение у *K. pneumoniae* гена *rmpA* указывает на гипервирулентный генотип бактерий [15]. Штаммы hv-КР, в отличие от «классических» низковирулентных штаммов (с-КР), характеризуются большей резистентностью к действию комплемента и фагоцитозу [11, 32]. Механизмы, обеспечивающие устойчивость hv-КР к фагоцитозу, включают низкую опсонизацию бактерий, связанную с наличием у них толстой капсулы, блокирование толл-подобных рецепторов (TLR), тормозящих синтез интерлейкина-8 – основного хемоаттрактанта нейтрофилов [11].

Среди факторов, обеспечивающих рост и выживание клебсиелл в организме инфицированного хозяина, важнейшими являются сидерофоры аэробактин, энтеробактин, иерсиниабактин и колибактин [11, 15]. Как известно, железо необходимо для роста и размножения бактерий. Доступ к железу служит ключевым фактором, обеспечивающим *K. pneumoniae* способность вызывать инвазивные формы заболевания в организме как иммунокомпromетированных, так и иммунокомпетентных людей [33]. Hv-КР продуцируют молекулы сидерофор в значительно большем количестве и в более активной форме, чем с-КР [33]. В нашем исследовании *rmpA* был выявлен в изолятах от детей с неонатальным сепсисом и пневмонией в 50% (6 детей) и 61% (8 детей) случаев соответственно. И хотя риск развития сепсиса ассоциировался не столько с экспрессией изолятами гена *rmpA*, сколько с продук-

цией БЛРС (OR=6,8; ДИ 3,6–12,7;  $p < 0,001$ ), следует все же признать, что неблагоприятный исход от неонатального сепсиса имел место у детей с гипервирулентными штаммами *K. pneumoniae*, являвшимися также продуцентами БЛРС. По данным литературы, летальность среди пациентов, инфицированных hv-КР, колеблется от 3 до 42% [16, 34], достигая максимума (55%) при развитии бактериемии [35]. Очевидно, что риск неблагоприятного исхода возрастает при наличии у hv-КР множественной резистентности к антибиотикам, что позволяет рассматривать их как чрезвычайно опасные супербактерии.

### Заключение

Риск развития локализованных и генерализованных форм неонатальной инфекции в значительной

мере определяется как неонатальными факторами, так и биологическими особенностями микроорганизма, его резистентностью и вирулентностью. Традиционно внебольничные штаммы высоковирулентны, «проигрывая» госпитальным в резистентности к антибиотикам. Мы же наблюдали клинические варианты заболевания, вызванные микробами, обладающими одновременно двумя свойствами — высокой агрессивностью и устойчивостью к антибактериальной терапии. Тяжелые формы и неблагоприятный исход — классические атрибуты болезней, вызванных этими, так называемыми гипервирулентными штаммами *K. pneumoniae*. Очевидно, что подобного рода клинические ситуации будут складываться в будущем, что необходимо учитывать в работе практическим врачам.

### ЛИТЕРАТУРА (REFERENCES)

1. Verma P., Berwal P.K., Nagaraj N., Swami S., Jivaji P., Narayan S. Neonatal sepsis: epidemiology, clinical spectrum. Recent antimicrobial agents and their antibiotic susceptibility pattern. *Int J Contemp Pediatr* 2015; 2: 176–180. DOI: 10.18203/2349-3291.ijcp20150523
2. Camacho-Gonzales A., Spearman P.W., Stoll B.J. Neonatal infectious diseases: evaluation of neonatal sepsis. *Pediatr Clin North A* 2013; 60: 367–389. DOI: 10.1016/j.pcl.2012.12.003
3. Borghesi A., Stronati M. Superbugs and antibiotics in the newborn. *Journal of Pediatric and Neonatal Individualized Medicine* 2015; 4(2): e040253. DOI: 10.7363/040253
4. Stoll B.J., Hansen N.I., Fanaroff A.A., Wright L.L., Carlo W.A., Ehrenkranz R.A. et al. Late onset sepsis in very low birth weight neonates: the experience of the NICHD Neonatal Research Network. *Pediatrics* 2002; 110: 285–291.
5. Dong Y., Speer C.P. Late-onset neonatal sepsis: recent developments. *Arch Dis Child Fetal Neonatal Ed* 2015; 100(3): F257–263. DOI: 10.1136/archdischild-2014-306213
6. Zea-Vera A., Ochoa T.J. Challenges in the diagnosis and management of neonatal sepsis. *J Trop Pediatr* 2015; 61: 1–13. DOI: 10.1093/tropej/fmu079
7. Podschun R., Ullmann U. *Klebsiella spp.* As Nosocomial Pathogens: Epidemiology, Taxonomy, Typing Methods, and Pathogenicity Factors. *Clin Microbiol Rev* 1998; 4: 11: 589–603.
8. Haller S., Eller C., Hermes J., Kaase M., Steglich M., Radonic A. et al. What caused the outbreak of ESBL-producing *Klebsiella pneumoniae* in a neonatal intensive care unit, Germany 2009 to 2012? Reconstructing transmission with epidemiological analysis and whole-genome sequencing. *BMJ* 2015; 5: e007397. DOI: 10.1136/bmjopen-2014-007397
9. Хартынов Х.С., Анохин В.А., Николаева И.В., Семенова Д.Р., Любин С.А., Агапова И.В. и др. Клебсиеллезный неонатальный сепсис. Медицинский вестник Северного Кавказа 2016; 11(1): 82–86. DOI: 10.14300/mnnc.2016.11004 [Khaertynov Kh.S., Anohin V.A., Nikolaeva I.V., Semenova D.R., Lyubin S.A., Agapova I.V. et al. Neonatal sepsis caused by *Klebsiella*. *Meditinskij vestnik Severnogo Kavkaza* 2016; 11:82–86. DOI: 10.14300/mnnc.2016.11004 (in Russ)]
10. Broberg C.A., Palacios M., Miller V.L. *Klebsiella*: a long way to go towards understanding this enigmatic jet-setter. *F1000Prime Reports* 2014; 6: 64: DOI: 10.12703/P6-64
11. Li B., Zhao Y., Liu C., Zhou D. Molecular pathogenesis of *Klebsiella pneumoniae*. *Future Microbiol* 2014; 9: 9: 1071–1081. DOI: 10.2217/fmb.14.48
12. Liu Y.C., Cheng D.L., Lin C.L. *Klebsiella pneumoniae* liver abscess associated with septic endophthalmitis. *Arch Intern Med* 1986; 146: 1913–1916.
13. Cheng D.L., Liu Y.C., Yen M.Y., Liu C.Y., Wang R.S. Septic metastatic lesions of pyogenic liver abscess. Their association with *Klebsiella pneumoniae* bacteremia in diabetic patients. *Arch Intern Med* 1991; 151: 1557–1559.
14. Wang J.H., Liu Y.C., Lee S.S., Yen M.Y., Chen Y.S., Wang J.H. et al. Primary liver abscess due to *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *Clin Infect Dis* 1998; 26: 1434–1438.
15. Shon A.S., Bajwa R.P., Russo T.A. Hypervirulent (hypermuticoviscous) *Klebsiella pneumoniae*: a new and dangerous breed. *Virulence* 2013; 4: 2: 107–118. DOI: 10.4161/viru.22718
16. Decré D., Verdet C., Emirian A., Le Gourrierec T., Petit J.C., Offenstadt G. et al. Emerging severe and fatal infections due to *Klebsiella pneumoniae* in two university hospitals in France. *J Clin Microbiol* 2011; 49: 3012–3014. DOI: 10.1128/JCM.00676-11
17. Bialek-Davenet S., Criscuolo A., Ailloud F., Passet V., Jones L., Delannoy-Vieillard A.S. et al. Genomic definition of hypervirulent and multidrug-resistant *Klebsiella pneumoniae* clonal groups. *Emerg Infect Dis* 2014; 20: 1812–1820. DOI: 10.3201/eid2011.14020622
18. Surlers L., Boyd A., Girard P.M., Arlet G., Decré D. ESBL-Producing Strain of Hypervirulent *Klebsiella pneumoniae* K2, France. *Emerging Infectious Diseases* 2016; 22(9): 1687–1688. DOI: 10.3201/eid2209.160681
19. Khaertynov Kh.S., Anokhin V.A., Davidyuk Y.N., Nicolaeva I.V., Khalioullina S.V., Semyanova D.R., Alatyrev E.Yu., Skvortsova N.N., Abrahamyan L.G. Case of meningitis in a neonate caused by an extended-spectrum-beta-lactamase-producing strain of hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Frontiers in Microbiology* 2017; 8: 1576. DOI: 10.3389/fmicb.2017.01576
20. Алексеев В.В., Алипов А.Н., Андреев В.А., Антонов В.Г., Асеев М.В., Бадиков В.Д. и др. Медицинские лабораторные технологии: руководство по клинической лабораторной диагностике. 3-е издание. Под редакцией А.И.Карпищенко. М: ГЭОТАР-Медиа 2013; 792. [Alekseev V.V., Alipov A.N., Andreev V.A., Antonov V.G., Aseev M.A., Badikov V.D. et al. *Medical laboratory technologies*. A.I. Karpishchenko (ed). Moscow: GEHOTAR-Media 2013; 792. (in Russ)]
21. Collee J.G., Mackie T.J., McCartney J.E. *Practical medical microbiology*, 14th edn. New York, Churchill Livingstone, 1996; 978.

22. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance standards for antimicrobial Susceptibility testing. 22ed. Informational Supplement. PA, USA, 2014; 32.
23. Luo Y., Wang Y., Ye L., Yang J. Molecular epidemiology and virulence factors of pyogenic liver abscess causing *Klebsiella pneumoniae* in China. *Clin Microbiol Infect* 2014; 20:818–824. DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/1469-0691.12664>
24. Compain F., Babosan A., Brisse S., Genel N., Audo J., Ailloud F. et al. Multiplex PCR for detection of seven virulence factors and K1/K2 capsular serotypes of *Klebsiella pneumoniae*. *J Clin Microbiol* 2014; 52: 4377–4380. DOI:10.1128/JCM.02316-14
25. Yu W.L., Ko W.C., Cheng K.C., Lee C.C., Lai C.C., Chuang Y.C. Comparison of prevalence of virulence factors for *Klebsiella pneumoniae* liver abscesses between isolates with capsular K1/K2 and non-K1/K2 serotypes. *Diagn Microbiol Inf Dis* 2008; 62: 1–6. DOI: 10.1016/j.diagmicrobio.2008.04.007
26. Lai Y.C., Lin A.C., Chiang M.K., Dai Y.H., Hsu C.C., Lu M.C. et al. Genotoxic *Klebsiella pneumoniae* in Taiwan. *PLOS ONE*. 2014; 9(5): e96292. DOI: 10.1371/journal.pone.0096292
27. Branswell H. WHO releases list of world's dangerous superbugs. *Stat* 2017; February: 27.
28. Cortese F., Scicchitano P., Gesualdo M., Filaninno A., De Giorgi E. Early and Late Infections in Newborns: Where Do We Stand? A Review. *Pediatr Neonatol* 2016; 57: 265–273. DOI: 10.1016/j.pedneo.2015.09.007
29. Samuelsson A., Isaksson B., Hanberger H., Olhager E. Late-onset neonatal sepsis, risk factors and interventions: an analysis of recurrent outbreaks of *Serratia marcescens*, 2006–2011. *J Hosp Infect* 2014; 86: 57–63. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhin.2013.09.017>
30. Rhodes A., Evans L.E., Alhazzani W., Levy M.M., Antonelli M., Ferrer R., Kumar A. et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Med* 2017; 43: 304–377. DOI: 10.1007/s00134-017-4683-6
31. Arif S.H., Ahmad I., Ali S.M., Khan H.M. Thrombocytopenia and Bacterial Sepsis in Neonates. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2012; 28(3): 147–151. DOI: 10.1007/s12288-011-0118-7
32. Doorduyn D.J., Rooijackers S.H.M., van Schaik W., Bar-doel B.W. Complement resistance mechanisms of *Klebsiella pneumoniae*. *Immunobiol* 2016; 221: 1102–1109. DOI: 10.1016/j.imbio.2016.06.014
33. Holden V.I., Breen P., Houle S., Dozois Ch.M., Bachman M.A. *Klebsiella pneumoniae* Siderophores Induce Inflammation, Bacterial Dissemination, and HIF-1 Stabilization during Pneumonia. *mBio* 2016; 7(5): e01397–16. DOI: 10.1128/mBio.01397-16
34. Fang C.T., Chen Y.C., Chang S.C., Sau W.Y., Luh K.T. *Klebsiella pneumoniae* meningitis: timing of antimicrobial therapy and prognosis. *QJM* 2000; 93: 45–53.
35. Lin Y.T., Jeng Y.Y., Chen T.L., Fung C.P. Bacteremic community-acquired pneumonia due to *Klebsiella pneumoniae*: clinical and microbiological characteristics in Taiwan, 2001–2008. *BMC Infect Dis* 2010; 10: 307. DOI: 10.1186/1471-2334-10-307

Поступила 27.07.18

Received on 2018.07.27

**Конфликт интересов:**

Авторы данной статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов и финансовой поддержки, о которых необходимо сообщить.

**Conflict of interest:**

The authors of this article confirmed the lack of conflict of interest and financial support, which should be reported.