

ОСОБЕННОСТИ БЕТА-ЛАКТАМАЗНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ АДЕНОВИРУСНОЙ ИНФЕКЦИЕЙ, ОСТРЫМ ГНОЙНЫМ ТОНЗИЛЛИТОМ, СЕРОЗНЫМИ И ГНОЙНЫМИ МЕНИНГИТАМИ

ЖИЛЬЦОВ И.В. , ВЕРЕМЕЙ И.С. , СЕМЕНОВ В.М. , ГЕНЕРАЛОВ И.И.

УО «Витебский государственный медицинский университет»

Резюме. Антибиотикоустойчивость болезнетворных бактерий считается одной из наиболее актуальных проблем современной инфектологии; тем не менее, до настоящего времени данное явление рассматривалось лишь как свойство микроорганизмов.

Ранее нами уже была описана относительно высокая бета-лактамазная активность сыворотки крови больных рожистым воспалением и пневмонией (И.В. Жильцов и соавт., 2009).

Соответственно, целью нашей работы было подтвердить, что сыворотка крови больных с инфекционными заболеваниями иной этиологии также способна разрушать антибиотики бета-лактамного ряда, и, помимо этого, оценить частоту встречаемости и уровень указанной активности. Мы обследовали 35 больных аденовирусной инфекцией, 42 больных острым гнойным тонзиллитом, 6 больных серозным менингитом, 5 больных гнойным менингитом, находившихся на лечении в Витебской областной инфекционной больнице в 2008/09 гг.

Для определения наличия и уровня бета-лактамазной активности сыворотки крови использовался модифицированный нами неокупроиновый метод (А. Menashi, 1988). В качестве субстратов реакции применялись ампициллин и бензилпенициллина натриевая соль (химически чистые субстанции производства Sigma).

Бета-лактамазная активность была выявлена у 88,6% (95% ДИ: 78,0-99,1) больных аденовирусной инфекцией, средний уровень распада внесенного в пробу антибиотика за 20 минут инкубации составил 23,5% для ампициллина и 16,9% для бензилпенициллина.

У больных острым гнойным тонзиллитом частота встречаемости бета-лактамазной активности крови оказалась равной 83,3% (95% ДИ: 72,1-94,6), причем средний уровень распада внесенных в пробу антибиотиков составил 28,7% для ампициллина и 21,1% для бензилпенициллина.

У больных серозными и гнойными менингитами бета-лактамазная активность крови была выявлена в 100% случаев, средний уровень распада ампициллина составил 43,3%, бензилпенициллина – 32,5%, что оказалось достоверно выше, чем в других группах обследованных больных. Установлены положительные корреляции средней силы между уровнем бета-лактамазной активности крови, с одной стороны, и продолжительностью госпитализации и назначением бета-лактамных антибиотиков – с другой.

Таким образом, подтверждается предположение о том, что бета-лактамазная активность крови широко распространена в человеческой популяции, выявляется при различных заболеваниях (а, возможно, и в норме) и представляет собой ответную реакцию организма на введение извне антибиотиков бета-лактамного ряда.

Ключевые слова: бета-лактамазная активность, сыворотка крови, аденовирусная инфекция, острый гнойный тонзиллит, серозные менингиты, гнойные менингиты, антибиотики бета-лактамного ряда.

Abstract. Antibiotic resistance of pathogenic bacteria is known to be one of the most challenging problems of up-to-date infectiology, but this phenomenon is still analyzed from the position of bacteria only.

The other day we described the relatively high beta-lactamase activity of blood serum of patients ill with erysipelas and pneumonia (I. Zhyltsou et al., 2009). Thus, the goal of our present study was to confirm that blood serum of patients with other communicable diseases also can destroy beta-lactams, and, besides, to assess frequency and level of above activity. We examined 35 patients with adenoviral infection, 42 patients with acute purulent tonsillitis, 6 patients with serous meningitis and 5 patients with purulent meningitis who were hospitalized to Vitebsk Regional Infectious Hospital in 2008-09. To determine the presence and level of beta-lactamase activity of blood serum, we used

adjusted neocuproine technique (A. Menashi, 1988), ampicillin and penicillin G (chemically pure substances by Sigma) were taken as substrates.

Beta-lactamase activity was found in 88,6% (95% CI: 78,0-99,1) of all patients ill with adenoviral infection (average levels of antibiotic destruction for 20 minutes of incubation were 23,5% for ampicillin and 16,9% for penicillin G).

Also, beta-lactamase activity was revealed in 83,3% of acute purulent tonsillitis cases (95% CI: 72,1-96,4); middle level of antibiotic destruction was found equal to 28,7% for ampicillin and 21,1% for penicillin G.

In patients with serous and purulent meningitis beta-lactamase activity of blood was found in 100% of all cases; its corresponding middle level of destruction was 43,3% for ampicillin and 32,5% for penicillin G what was found to be reliably higher than the same characteristics of other investigated groups of patients.

We have also revealed several reliable direct correlations of moderate power between the level of blood beta-lactamase activity on the one hand and both duration of hospitalization and prescription of beta-lactams on the other hand.

Thus, our assumption that beta-lactamase activity is very common in human population and can be found in patients ill with a number of diseases (perhaps, also in normal healthy individuals) and it's a response of the organism towards the prescription of beta-lactams has been once again confirmed.

Keywords: Beta-lactamase activity, human blood serum, adenoviral infection, acute purulent tonsillitis, serous meningitis, purulent meningitis, antibiotics of beta-lactam group.

Адрес для корреспонденции: Республика Беларусь, 210023, г. Витебск, пр.Фрунзе, 27, УО «Витебский государственный медицинский университет», кафедра инфекционных болезней, тел. 24-33-46 - Жильцов И.В.

Антибиотикоустойчивость бактерий на текущий момент является одной из наиболее важных и актуальных проблем инфектологии. Практически все известные науке бактерии – возбудители инфекционных заболеваний (за редким исключением)

в большей или меньшей степени проявляют устойчивость к тем или иным антибактериальным препаратам.

Основным механизмом устойчивости бактерий к бета-лактамам является синтез разнообразных бета-лактамаз. В то же время, сам макроорганизм небезразличен к введению антибиотиков. В частности, в наших предыдущих работах было показано, что в крови у 33,82% больных шигеллезом определяются поликлональные антитела субклассов G1, 2 и 4, обладающие бета-лактамазной активностью (причем у некоторых препаратов иммуноглобулинов данная активность оказалась довольно значительной) [1]. Формирование в организме таких антител, обладающих каталитической активностью («абзимов»), объясняется исходя из теории иммунологических сетей Ерне [2].

В целом необходимо отметить, что метаболизм бета-лактамов антибиотиков в организме изучен недостаточно, причем все крупные зарубежные исследования в этом направлении были свернуты к началу 90-х гг. прошлого века, сменившись узкоприкладными, сугубо специализированными научными работами. Так, известно, что введенные парентерально бета-лактамы связываются с различными белками крови (от 19 до 96% введенного препарата, в зависимости от его химических особенностей), преимущественно – с альбуминами [3].

В дальнейшем антибиотик взаимодействует с пенициллин-связывающими белками (ПСБ) бактерий, из которых наиболее известна D-аланин-карбоксипептидаза (всего число известных ПСБ у различных бактерий достигает 12). Бета-лактамы являются аналогами переходного состояния основного субстрата для данного фермента – ацил-D-аланил-D-аланиновых окончаний главной составляющей бактериальной стенки – мурамилпептида (пептидогликана); они вступают в конкуренцию с D-аланил-D-аланиновыми остатками за активный центр D-аланин-карбоксипептидазы; в процессе взаимодействия бета-лактамовая связь антибиотика разрывается ферментом и ковалентно связывается с остатком цистеина (по другим данным, с остатком серина [4]), образуя тиоэфир.

Получившийся в результате комплекс «фермент-пенициллоиловая кислота» стабилен (в отличие от комплекса «фермент-субстрат»), вследствие чего происходит необратимое ингибирование фермента (т.е. бета-лактамы – это т.н. «субстрат-убийца» – killing substrate) [5]. При этом происходит нарушение формирования перекрестных связей молекул пептидогликана между собой, клеточная стенка бактерий получается рыхлой и перестает предохранять бактерий от осмотического лизиса. Показано, в частности, что в гиперосмолярной среде лизиса бактерий, подвергшихся действию пенициллина, не происходит; кроме того, бета-лактамы эффективно воздействуют только на активно размножающиеся бактерии, не влияя на покоящиеся [5]. Остатки антибиотика, не связавшиеся бактериальной клеткой, достаточно быстро выводятся почками (так, период полувыведения бензилпенициллина – 0,5-1 час с момента введения) [6].

При внешней убедительности приведенные данные неполны. Например, доподлинно неизвестно, с какими белками в плазме крови связываются бета-лактамы, насколько прочна данная связь, происходят ли химические либо конформационные изменения молекул антибиотика в процессе транспортировки, какая именно фракция антибиотика (связанная либо несвязанная) имеет большее бактерицидное значение. В частности, имеются косвенные свидетельства того, что лишь малая часть введенных извне бета-лактамов достигает ПСБ бактерий. Так, по данным различных исследователей, грам-положительные микроорганизмы связывают от 4 до 15 нмоль пенициллина на 1 грамм сухого веса бактерий (от 100 до 10.000 молекул пенициллина на бактерию, в среднем 1000-4000 молекул); грам-отрицательные микроорганизмы связывают в среднем в 5-10 раз меньше [5]. Таким образом, бета-лактамы вводятся в организм с огромным избытком, вероятно, необходимым для покрытия естественной утраты антибиотиков в процессе транспортировки и распределения в тканях.

Известно, что за разрушение бета-лактамовых антибиотиков отвечают бактериальные ферменты из группы бета-лактамаз, причем в человеческом организме аналоги данного фермента отсутствуют [7]. Тем не менее, имеются публикации, утверждающие, что гемолизированная кровь может разрушать 3-

ацетоксиметил-цефалоспорины (цефалотин, цефотаксим) посредством деацетиляции 3- ацетоксиметильной группы; при этом плазма и сыворотка крови, не содержащие продуктов лизиса эритроцитов, такой активностью не обладали. Следует отметить, что в данном случае бета-лактазная связь не разрушается, из-за чего цефалоспорины, не содержащие 3-ацетоксиметильной группы (цефалоридин, цефалексин, цефамандол, цефазолин), не утрачивали активности в присутствии гемолизированной крови [8]. Данное наблюдение показывает, что антибиотики бета-лактамного ряда в принципе могут разрушаться какими-либо компонентами цельной крови, и, возможно плазмы или сыворотки крови, кроме бета-лактамаз (в частности, каталитическими антителами, о чем говорилось выше) [1]. Более того, давно известно, что карбапенемы (в частности, имипенем) разрушаются почечными дегидропептидазами, причем продукты распада нейротоксичны для некоторых млекопитающих; именно поэтому в состав коммерческого препарата имипенема был введен ингибитор почечных дегидропептидаз циластатин [9]. Показано также, что аналоги карбапенемов (в частности, $(\pm)$ -2-метилпенем-3-карбоксиловая кислота, или BCL-98) разрушаются альбуминами человеческой (а также крысиной и собачьей) крови, причем данную активность опосредуют участки альбуминов, содержащие аминокислоты лизин и L-триптофан; глобулиновая фракция крови указанной активностью не обладает [10].

Обнаружение в крови больных факторов (возможно, нескольких), эффективно разрушающих бета-лактазные антибиотики, может прямо указывать на одну из причин низкой эффективности указанных антибиотиков в лечении таких больных. Возможно, именно инактивация антибиотиков макроорганизмом лежит в основе феномена появления антибиотикорезистентности *in vivo* при её отсутствии или незначительной выраженности *in vitro*, неоднократно наблюдавшегося клиницистами. Ранее механизмы и проявления «биологической» антибиотикорезистентности не изучались. Ранее нами уже была описана относительно высокая бета-лактамазная активность сыворотки крови больных рожистым воспалением и пневмонией [11].

Соответственно, целью нашей работы было подтвердить, что сыворотка крови больных с инфекционными заболеваниями иной этиологии также способна

разрушать антибиотики бета-лактаминового ряда, и, помимо этого, оценить частоту встречаемости и уровень указанной активности. Для этого мы выбрали две категории доступных для обследования больных - с аденовирусной инфекцией и острым гнойным тонзиллитом; по контрасту с предыдущими обследованными группами, данные заболевания протекают нетяжело, продолжительность госпитализации обычно небольшая, антибактериальная терапия либо не проводится (как при аденовирусной инфекции), либо она кратковременна (как при остром гнойном тонзиллите); указанные заболевания в целом не склонны к затяжному либо рецидивирующему течению.

Кроме того, обе болезни чаще регистрируются у молодых (до 30 лет) лиц обоего пола. В этой связи в крови указанных больных можно было бы ожидать невысокий уровень бета-лактаминазной активности, соответствующий таковому в генеральной совокупности (или ниже). Для сравнения в исследование были включены небольшие (и нерепрезентативные) группы больных вирусными серозными менингитами и гнойными менингитами неуточненной этиологии.

Методы

1. Получение сыворотки крови . Сыворотка крови больных была получена центрифугированием крови, выдержанной в холодильной камере при 4°C в течение 4-6 часов для образования фибринового сгустка; использовалось центрифугирование в угловой центрифуге при 3000 об/мин в течение 15 минут. Полученная сыворотка крови сохранялась до момента эксперимента в морозильной камере при -20°C; допускалось только однократное размораживание пробы непосредственно перед экспериментом.

2. Методика определения бета-лактаминазной активности. Бета-лактаминазная активность сыворотки крови определялась посредством модифицированного неокупроинового метода [12].

Все используемые реагенты имели квалификацию не ниже ч.д.а. Измерение оптических плотностей проводили на спектрофлуориметре SOLAR-CM2203, (гос. рег. № РБ 03 11 2864 06) в режиме спектрофотометрии.

В качестве субстратов для определения каталитической активности сыворотки крови мы использовали бензилпенициллина натриевую соль и ампициллина тригидрат (химически чистые субстанции производства Sigma).

0,05 мл раствора каждого из двух упомянутых антибиотиков в концентрации 0,18 мг/мл смешивали с исследуемой сывороткой крови в соотношении 1:1 и помещали в термостат ($t=37^{\circ}\text{C}$) на 20 минут. Спустя указанное время к тест-объектам прибавляли 0,4 мл ацетатного буфера ($\text{pH}=4,75$), 0,5 мл неокупроинового реагента и выдерживали при комнатной температуре в течение 30 минут до развития стабильной желтой окраски. Затем измеряли оптическую плотность образовавшихся комплексов при 454,5 нм. При этом точная длина оптического пути составляла 10 мм.

В качестве контролей использовали:

1) модельные растворы бензилпенициллина и ампициллина (по 0,05 мл каждого), разведенные дистиллированной водой в соотношении 1:1, без добавления сыворотки крови;

2) образцы всех исследованных сывороток крови (по 0,05 мл), разведенные дистиллированной водой в соотношении 1:1, без добавления модельных антибиотиков;

3) модельные растворы бензилпенициллина и ампициллина (по 0,05 мл каждого), предварительно полностью гидролизованные инкубацией с 0,2 М гидроокисью натрия при 37°C в течение 30 минут.

В дальнейшем определялась доля антибиотика, распавшегося в пробе за время инкубации, как отношение разности ОП в опытной пробе и ОП в контрольной пробе с соответствующей исследуемой сывороткой к средней ОП в пробах с полностью распавшимся антибиотиком (ампициллином либо бензилпенициллином). Вычисленное значение выражалось в процентах.

В данном случае была применена модификация неокупроиновой методики без депротеинизации, что позволило: а) исключить потери антибиотика на этапе депротеинизации и повысить точность исследования; б) сократить время и уменьшить трудоемкость проведения исследования. При этом, чтобы избежать

неизбежного помутнения раствора после добавления неокупроинового реагента, в пробы вносилось уменьшенное в 3 раза против прежнего количество сыворотки. Вследствие этого, результаты данного исследования нельзя сравнивать с полученными ранее.

3. Дизайн исследования. Дизайн собственно исследования – срезное (cross-sectional; изучаемый признак оценивался одновременно и однократно во всех исследуемых подгруппах).

4. Клиническая характеристика больных, вошедших в исследование

В данное исследование были включены 88 человек, находившихся на лечении в диагностическом отделении Витебской областной инфекционной клинической больницы (ВОИКБ) в 2008-2009 гг. Указанные больные были разделены на 4 группы:

1. 35 больных с клиническим диагнозом «аденовирусная инфекция»;
2. 42 больных с диагнозом «острый гнойный тонзиллит»;
3. 6 больных с диагнозом «серозный вирусный менингит неуточненный»;
4. 5 больных с диагнозом «гнойный менингит неуточненный».

Средний возраст больных в указанных группах, а также соотношение мужчин и женщин в каждой из групп показано в таблице 1.

Таблица 1

Распределение обследованных больных по возрасту и полу

Группы	В целом		Мужчины		Женщины	
	К-во, n (%)	Средний возраст (ДИ)	К-во, n (%)	Средний возраст (ДИ)	К-во, n (%)	Средний возраст (ДИ)
Вся группа	88	21,6 лет min 12, max 62 95% ДИ: 19,6-23,6	40 (45,5)	22,0 года min 12, max 51 95% ДИ: 18,8-25,1	48 (54,5)	21,3 года min 13, max 62 95% ДИ: 18,6-24,1
Адено-вирусная инфекция	35	20,4 года min 13, max 62 95% ДИ: 16,9-24,0	11 (31,4)	18,8 лет min 13, max 27 95% ДИ: 15,9-21,7	24 (68,6)	21,2 года min 13, max 62 95% ДИ: 16,0-26,3
Острый гнойный тонзиллит	42	21,2 года min 12, max 44 95% ДИ: 18,9-23,6	23 (54,8)	21,0 лет min 12, max 44 95% ДИ: 17,1-25,0	19 (45,2)	21,5 лет min 14, max 37 95% ДИ: 18,9-24,1
Серозный вирусный менингит	6	25,5 лет min 13, max 51 95% ДИ: 11,2-39,8	4 (66,7)	27,5 лет min 13, max 51 95% ДИ: 0,3-54,7	2 (33,3)	21,5 лет min 20, max 23 95% ДИ: 2,4-40,6
Гнойный менингит	5	28,6 лет min 14, max 45 95% ДИ: 13,3-43,9	2 (40,0)	38,5 лет min 32, max 45	3 (60,0)	22,0 года min 14, max 33

Из таблицы 1 видно, что среди обследованных больных преобладали молодые люди в возрасте 20-25 лет, а соотношение мужчин и женщин было различным в каждой группе и составляло от 1,2 : 1 (острый гнойный тонзиллит) до 1 : 2,2 (аденовирусная инфекция); в целом пропорция женщин в изучаемых группах оказалась несколько выше, чем мужчин (54,5% против 45,5%, соответственно). Возрастной и половой состав обследованных больных является типичным для изучаемых заболеваний.

У 21 больного наблюдалось легкое течение заболевания (аденовирусная инфекция - 9, острый гнойный тонзиллит - 11, серозный вирусный менингит - 1), у 56 - среднетяжелое течение (аденовирусная инфекция - 23, острый гнойный тонзиллит - 28, серозный вирусный менингит - 5), у 6 - тяжелое течение (аденовирусная инфекция - 2, гнойный менингит - 4), и у 1 - крайне тяжелое течение (гнойный менингит).

Видно, что в подавляющем большинстве случаев (66,7%, 95% ДИ: 56,6-76,8) наблюдалось среднетяжелое течение заболевания; доля легкого течения также была значительной (25,0%, 95% ДИ: 15,7-34,3). В то же время у всех больных гнойным менингитом наблюдалось тяжелое либо крайне тяжелое течение заболевания, что отражает клинические особенности данной группы болезней. Все степени тяжести были выставлены в соответствии с протоколами обследования и лечения взрослых больных в стационарных условиях, которые являются руководящим документом для осуществления клинической работы во всех стационарах Республики Беларусь.

Большинство больных, вошедших в исследование, получали ту или иную антибактериальную терапию.

Так, в группе больных аденовирусной инфекцией наиболее популярным антибиотиком оказался амоксициллин (12 человек – 34,3%, средняя продолжительность курса терапии 5,5 сут., 95% ДИ: 4,5-6,5), за ним следует цефотаксим (10 человек - 29,4%, средняя продолжительность курса терапии 5,9 сут., 95% ДИ: 3,9-7,9), на третьем месте – ампициллин (9 человек – 26,5%, средняя продолжительность курса терапии 5,2 сут., 95% ДИ: 3,3-7,1). Кроме того, некоторые больные получали пенициллин (2 человека), цефазолин (4 человека), азитромицин (3

человека), линкомицин (2 человека), гентамицин (1 человек). Средняя продолжительность антибактериальной терапии в группе составила 6,1 сут. (95% ДИ: 5,5-6,7). Мода количества одновременно назначенных антибиотиков – 1 (n=32), мода числа смен терапии – 0 (n=24). Несмотря на вирусную природу аденовирусной инфекции, все больные получали какие-либо антибактериальные препараты из вышеперечисленных.

В группе больных острым гнойным тонзиллитом преобладало назначение пенициллина (n=27, 69,2%, средняя продолжительность курса лечения 5,9 сут., 95% ДИ: 5,0-6,8), второе место принадлежит цефотаксиму (n=7, 17,9%, средняя длительность лечения 5,4 сут., 95% ДИ: 3,9-6,9), третье место делят амоксициллин и линкомицин (в обоих случаях n=6, 15,4%; средняя длительность лечения амоксициллином 4,2 сут., 95% ДИ: 2,0-6,3; средняя длительность лечения линкомицином 4,8 сут., 95% ДИ: 2,1-7,5). Кроме того, больные из данной группы получали цефазолин (n=1), ампициллин (n=4) и азитромицин (n=2). Средняя продолжительность антибактериальной терапии в группе составила 7,5 сут. (95% ДИ: 6,9-8,1). Мода количества одновременно назначенных антибиотиков - 1 (n=36), мода числа смен терапии – 0 (n=23).

В группе больных серозным менингитом, несмотря на предполагаемую вирусную этиологию процесса, все больные также получали антибактериальную терапию. При этом в большинстве случаев (n=4,66,7%) был назначен цефтриаксон (средняя продолжительность курса терапии 11,0 сут., 95% ДИ: 3,2-18,8). Также назначались цефотаксим (n=1) и азитромицин (n=1). Средняя продолжительность антибактериальной терапии в группе составила 9,4 сут. (95% ДИ: 2,5-16,3). Мода количества одновременно назначенных антибиотиков – 1 (n=6), мода числа смен терапии – 0 (n=6).

В группе больных гнойным менингитом больные получали цефотаксим (n=2), цефтриаксон (n=2), азитромицин (n=1), амикацин (n=1), ампициллин (n=1), меропенем (n=2), хлорамфеникол (n=1), гентамицин (n=1). Средняя продолжительность антибактериальной терапии в данной группе составила 18,3 сут.

(95% ДИ: 14,5-22,1). Мода количества одновременно назначенных антибиотиков – 2 (n=3), мода числа смен терапии – 2 (n=3).

Значительное количество антибактериальных препаратов, назначаемых больным из данной группы, и частая их смена обусловлены особо тяжелым течением указанного заболевания и нередко – отсутствием улучшения состояния и самочувствия больных на фоне проводимой массивной этиотропной терапии.

Видно, что в структуре антибактериальной терапии, проводимой обследованным больным, преобладали антибиотики бета-лактаминового ряда (пенициллин, цефотаксим, цефтриаксон, ампициллин, амоксициллин и др.).

5. Статистический анализ результатов исследования

Статистический анализ результатов исследования был выполнен с использованием аналитического пакета Statistica 7.0.

Для проверки нормальности распределения изучаемых количественных признаков применялся тест Колмогорова-Смирнова, для выявления корреляционных взаимосвязей – ранговый анализ Спирмена (Spearman), для проверки достоверности различий изучаемых количественных признаков в двух независимых выборках – U-тест Манна-Уитни (Mann-Whitney), в нескольких (>2) независимых выборках – тест Краскелла-Уоллиса (Kruskal-Wallis).

Частоты встречаемости признаков сравнивались по критерию χ^2 , а при анализе малых (< 10 человек) групп - с помощью точного теста Фишера (Fisher's exact test). При проверке нормальности распределения выяснилось, что распределение всех изучаемых признаков нормальным не являлось; преобладали смещенные типы распределения.

Соответственно, для дальнейшего статистического анализа полученных результатов использовались только непараметрические методы анализа (см. выше).

Результаты исследования

Частота встречаемости и средний уровень распада бензилпенициллина и ампициллина по группе в целом и во всех изученных группах больных по отдельности приведены в таблице 2.

Частота встречаемости и средний уровень распада бензилпенициллина и ампициллина в изученных группах

Группы	Распад ампициллина		Распад бензилпенициллина	
	Частота встречаемости, % (95% ДИ)*	Средний уровень распада, в % от исходного кол-ва (95% ДИ)**	Частота встречаемости, % (95% ДИ)*	Средний уровень распада, в % от исходного кол-ва (95% ДИ)**
Вся группа	87,5% (95% ДИ: 80,6-94,4)	28,0% (95% ДИ: 24,75-31,27) min 2,0, max 87,0	77,3% (95% ДИ: 68,5-86,0)	20,2% (95% ДИ: 16,89-23,44) min 1,4, max 88,2
Аденовирусная инфекция	88,6% (95% ДИ: 78,0-99,1)	23,5% (95% ДИ: 19,34-27,75) min 2,0, max 42,3	74,3% (95% ДИ: 59,8-88,8)	16,9% (95% ДИ: 15,78-26,32) min 4,8, max 88,2
Острый гнойный тонзиллит	83,3% (95% ДИ: 72,1-94,6)	28,7% (95% ДИ: 23,39-34,06) min 6,7, max 87,0	76,2% (95% ДИ: 63,3-89,1)	21,1% (95% ДИ: 15,78-26,32) min 4,8, max 88,2
Серозный вирусный менингит	100%	34,2% (95% ДИ: 21,35-46,95) min 17,7, max 43,7	83,3% (95% ДИ: 53,5-100)	18,9% (95% ДИ: 0-43,39) min 1,4, max 41,4
Гнойный менингит	100%	43,3% (95% ДИ: 26,36-60,32) min 20,6, max 54,1	100%	32,5% (95% ДИ: 11,13-53,83) min 13,0, max 59,3

Примечание:

* Указана частота выявления бета-лактамазной активности, отличной от нуля;

** 1. Средний уровень распада обоих модельных антибиотиков указан в % распавшегося за время инкубации (20 мин) антибиотика от его количества, исходно внесенного в пробу; 2. Средний уровень распада обоих антибиотиков получен усреднением значений активности, отличных от нуля.

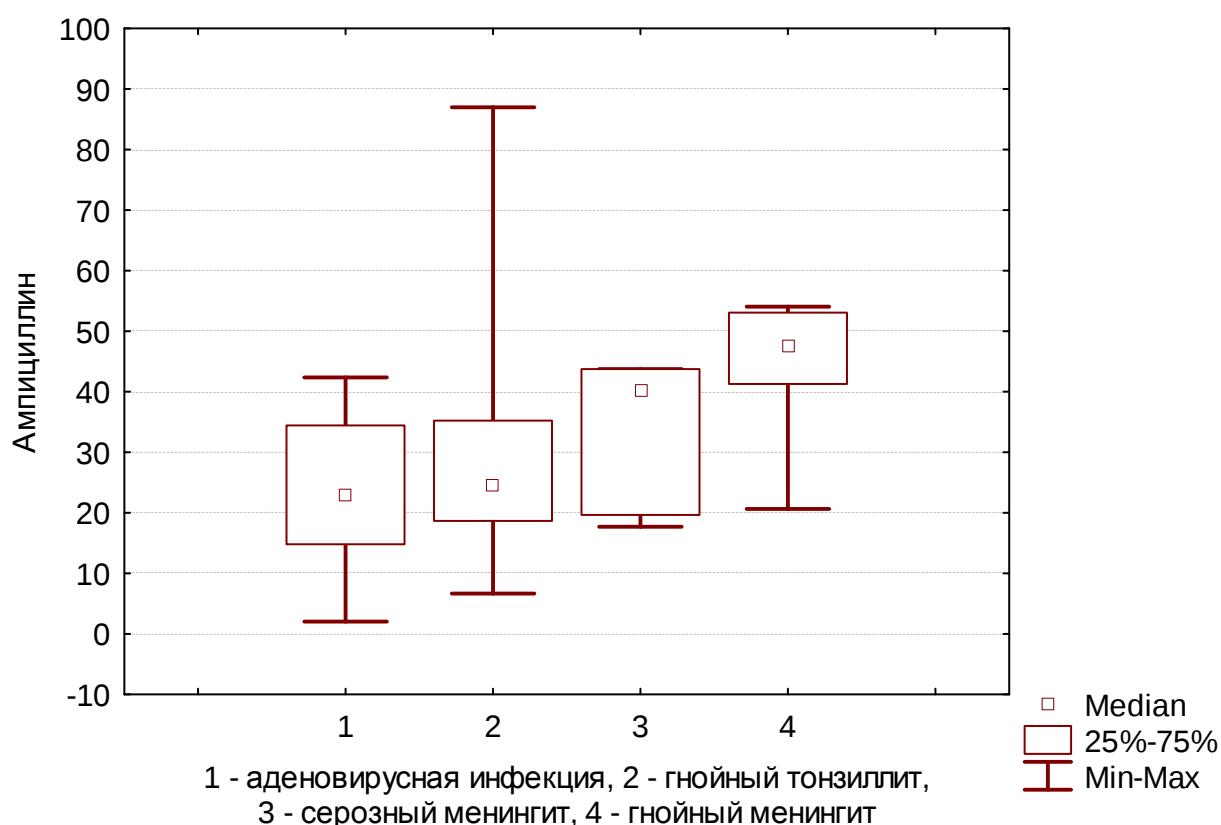


Рис. 1. Уровень распада ампициллина в сыворотке крови обследованных больных.

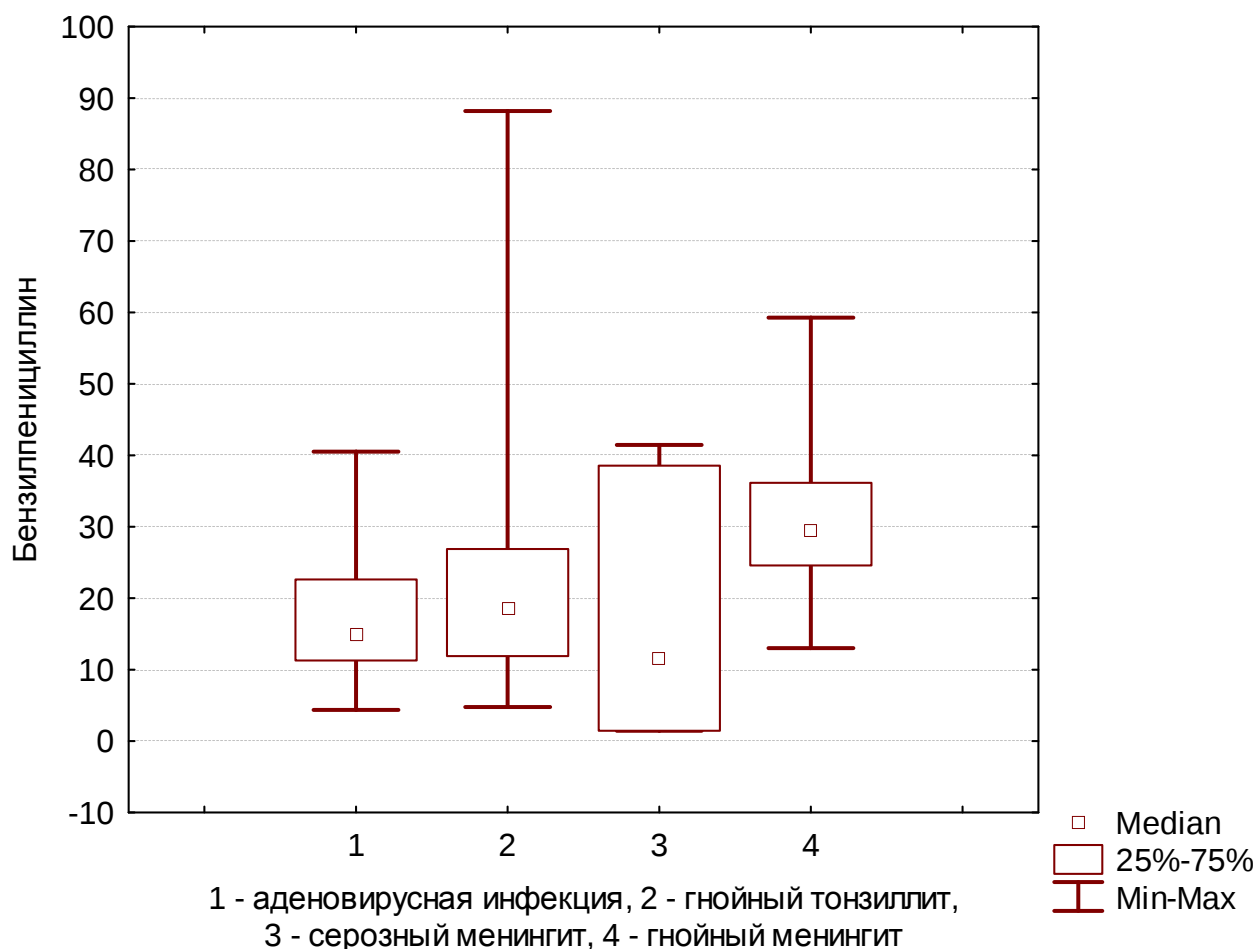


Рис. 2. Уровень распада бензилпенициллина в сыворотке крови обследованных больных.

На рисунках 1-2 приведены графики распределения относительных величин бета-лактамазной активности сыворотки крови больных в изученных группах, отдельно для ампициллина и бензилпенициллина. Графики имеют вид «box-and-whisker» («ящик с усами»), где нижний «ус» соответствует минимальному зафиксированному значению активности, верхний «ус» – соответственно, максимальному значению, нижний край «ящика» – 1 квартилю (25 процентилю), верхний край – 3 квартилю (75 процентилю), квадратик в «ящике» – медиане. Указанный вид графиков наилучшим образом характеризует дисперсию значений признаков в распределениях, отличающихся от нормального (Гауссового). Видно, что средний уровень относительного распада обоих антибиотиков оказался

сравнительно невысоким во всех изученных группах – в пределах 20-30% от внесенного в пробу количества субстрата.

Тем не менее, отмечается некоторая тенденция к нарастанию бета-лактамазной активности у больных с серозным менингитом по сравнению с аденовирусной инфекцией и острым гнойным тонзиллитом; в группе больных гнойным менингитом уровень сывороточной активности еще выше. В то же время, малый размер групп больных менингитами не позволяет проследить какую-либо общую для таких больных закономерность – полученные результаты могут быть случайной флуктуацией, артефактом. Отмечаются также большие индивидуальные различия в выраженности бета-лактамазной активности крови – у различных больных она колеблется от 0 до 88%.

Кроме того, необходимо отметить, что тот или иной уровень пенициллиназной активности был выявлен в крови у большинства обследованных больных (от 74% в группе больных аденовирусной инфекцией до 100% в группе больных гнойным менингитом).

Проверка по критерию χ^2 и точный тест Фишера не выявили достоверных различий в частоте встречаемости бета-лактамазной активности сыворотки крови между различными группами обследованных больных ($p=0,28...1,0$).

Сравнение методом Краскелла-Уоллиса показало статистически значимые различия между количественными уровнями бета-лактамазной активности в сравниваемых группах больных, как в отношении степени распада ампициллина ($p=0,018$), так и в плане выраженности распада бензилпенициллина ($p=0,059$). Попарное сравнение исследуемых групп с использованием U-теста Манна-Уитни показало, что:

1) уровень распада ампициллина в группе больных серозными менингитами значимо выше, чем в группе больных аденовирусной инфекцией ($p=0,034$);

2) уровни распада как бензилпенициллина, так и ампициллина в группе больных гнойными менингитами оказались значимо выше, чем в группах больных аденовирусной инфекцией ($p=0,0049$ для ампициллина, $p=0,0041$ для

бензилпенициллина) и острым гнойным тонзиллитом ($p=0,018$ и $0,020$ для ампициллина и бензилпенициллина, соответственно).

3) не выявлено значимых различий в уровнях сывороточной бета-лактамазной активности между больными аденовирусной инфекцией и острым гнойным тонзиллитом, а также между больными серозными и гнойными менингитами ($p=0,10...0,92$).

Можно констатировать, что больные серозными и, особенно, гнойными менингитами демонстрируют достоверно более высокий уровень сывороточной бета-лактамазной активности, чем более легкие и быстропротекающие заболевания – аденовирусная инфекция и острый гнойный тонзиллит, что вполне укладывается в современные представления о механизме формирования «биологической» антибиотикоустойчивости.

Ранговый корреляционный анализ по методу Спирмена выявил следующие взаимосвязи между наличием и уровнем бета-лактамазной активности сыворотки крови и существенными клинико-лабораторными показателями, характеризующими особенности течения рассматриваемых заболеваний:

1. Во всех изученных группах больных выявлена сильная положительная корреляция между уровнями распада бензилпенициллина и ампициллина ($r=+0,62...+0,66$, $p<0,0001$). Данная взаимосвязь указывает на общность механизмов распада ампициллина и бензилпенициллина, что уже отмечалось нами ранее [11];

2. Слабая взаимосвязь между продолжительностью госпитализации и уровнями распада ампициллина ($r=+0,33$, $p<0,005$) и бензилпенициллина ($r=+0,27$, $p<0,05$; в группе больных аденовирусной инфекцией $r=+0,37$, $p<0,05$). Указанная зависимость, возможно, указывает на взаимосвязь между наличием и уровнем бета-лактамазной активности сыворотки крови и продолжительностью антибактериальной терапии, а, возможно, и степенью тяжести заболевания;

3. Слабая взаимосвязь между уровнем распада бензилпенициллина и фактом назначения цефотаксима ($r=+0,30$, $p<0,01$), а также продолжительностью лечения цефотаксимом ($r=+0,30$, $p<0,01$). Аналогичная взаимосвязь выявлена и для уровня распада ампициллина (в обоих случаях $r=+0,23$, $p<0,05$). Данная взаимосвязь

косвенно указывает на то, что бета-лактамазная активность сыворотки крови обусловлена каким-либо индуцибельным фактором, появляющимся в крови в ответ на назначение бета-лактамных антибиотиков (например, цефотаксима), причем концентрация указанного гипотетического фактора линейно зависит от продолжительности антибактериальной терапии;

4. Сильная взаимосвязь между уровнем распада ампициллина и уровнем глюкозы крови ($r=+0,75$, $p<0,01$). Данная взаимосвязь, возможно, указывает на один из возможных механизмов образования в крови белков с бета-лактамазной активностью, а именно их гликозилирование.

При этом, учитывая небольшой размер групп больных, включенных в эксперимент, и многократное повторение статистических процедур, следует в первую очередь принимать во внимание те корреляционные взаимодействия, где показатель вероятности нулевой гипотезы (p) равен 0,01 и менее.

Ввиду слишком малого размера групп больных серозными и гнойными менингитами (6 и 5 человек, соответственно) корреляционный анализ в указанных группах не проводился, т.к. любые его результаты заведомо оказались бы артефактами.

Следует отметить, что описанная ранее (в группах больных рожей и пневмонией [11]) сильная положительная корреляция между уровнем бета-лактамазной активности крови и концентрацией общего/ прямого билирубина ($r=+0,9...1,0$, $p<0,05$) в данном случае не была обнаружена. Вероятно, это обусловлено тем, что из всех больных, вошедших в выборку, уровень билирубина был определен только у трех (из 88), что исключает достоверную оценку указанной зависимости.

Возможная практическая значимость выявленного феномена

В этом разделе мы представили очень приблизительный анализ вклада обнаруженного и описанного нами явления в общую структуру разрушения изученных бета-лактамных антибиотиков (ампициллина и бензилпенициллина) в процессе их циркуляции в крови. В частности, с учетом того, что:

- 1) объем циркулирующей крови у взрослого человека составляет около 5 литров,

2) и ампициллин, и бензилпенициллин назначаются парентерально по 1-1,5 грамма препарата 4 раза в сутки (4-6 раз в сутки для пенициллина), и, соответственно, период активной циркуляции препарата в крови составляет 4-6 часов, то концентрация обоих препаратов в крови непосредственно после инъекции составляет около 0,2-0,3 мг/мл, что хорошо соотносится с использованной нами в эксперименте концентрацией указанных антибиотиков (0,18 мг/мл).

Можно предположить, что при выявленном нами среднем уровне распада ампициллина в 28% и бензилпенициллина в 20% от исходно введенного (за 20 минут инкубации при 37°C) концентрация обоих антибиотиков в крови существенно снижается за относительно небольшой (не более 2,5 часов) срок с момента их парентерального введения, что подчеркивает *практическую значимость* описанного феномена: при идентификации фактора (или нескольких), ответственных за проявление собственной бета-лактамазной активности крови, и нахождении способа его (их) эффективного ингибирования можно было бы существенно снизить используемые в клинической практике дозировки бета-лактамов антибиотиков, что повлекло бы за собой как существенную экономию средств, ассигнуемых на этиотропную терапию, так и заметное сокращение частоты побочных эффектов лечения.

Заключение

3.1. Не вызывает сомнения, что кровь больных аденовирусной инфекцией, острым гнойным тонзиллитом, серозными и гнойными менингитами способна осуществлять эффективный специфический (по бета-лактамовой связи) гидролиз бета-лактамов антибиотиков. Степень выраженности пенициллиназной активности сыворотки крови зависит от проводимой антибактериальной терапии (в частности, от факта назначения и продолжительности лечения цефотаксимом), а также от продолжительности госпитализации. Возможно, проявление бета-лактамазной активности крови является ответной реакцией организма на длительное введение бета-лактамов антибиотиков. Кроме того, у больных менингитами (особенно – гнойными) уровень бета-лактамазной активности крови достоверно выше, чем при менее тяжелых и продолжительных инфекционных заболеваниях.

3.2. Вновь выявлена сильная прямая корреляция между уровнями распада ампициллина и бензилпенициллина, что косвенно указывает на то, что данный процесс осуществляется одним и тем же фактором (факторами), и, возможно, по сходному механизму.

3.3. Уровень описанной собственной бета-лактамазной активности крови достаточен для существенного снижения концентрации исследованных антибиотиков в крови за время их эффективной циркуляции, что указывает на большую практическую значимость обнаруженного феномена.

Таким образом, подтверждается предположение о том, что бета-лактамазная активность крови широко распространена в человеческой популяции, выявляется при различных заболеваниях (а, возможно, и в норме) и представляет собой ответную реакцию организма на введение извне антибиотиков бета-лактамного ряда.

Что интересно, выявленная другими авторами [8] зависимость вышеупомянутой активности крови от уровня гемолиза эритроцитов не нашла подтверждения в настоящем исследовании.

Описанный феномен имеет большое клиническое значение, т.к. может приводить к неучтенному ранее существенному снижению концентрации антибиотиков в крови за время, сравнимое с периодом их полувыведения, что может объяснить некоторые из наблюдаемых случаев неэффективности антибактериального препарата *in vivo* при его доказанной микробиологической эффективности *in vitro*.

Кроме того, в случае выявления высокой бета-лактамазной активности крови возможно изменение проводимой конкретному больному антибактериальной терапии - назначение какого-либо антибактериального препарата из других фармакологических групп; своевременная коррекция проводимой этиотропной терапии позволит ускорить выздоровление и сократить продолжительность госпитализации больного. Несомненно, необходимы дальнейшие лабораторные и клинические исследования обнаруженного феномена, который представляет

существенный теоретический и практический интерес для клиники инфекционных болезней.

Литература

1. Особенности «биологической» антибиотикоустойчивости при шигеллезах: выявление *in vivo* поликлональных IgG, обладающих пенициллиназной активностью / И. В. Жильцов [и др.] // Медицинская панорама. – 2006. – № 5 (62). – С. 46-48.
2. Jerne, N. K. Towards a network theory of the immune system / N. K. Jerne // Ann.Immunol. (Inst.Pasteur). – 1974. – Vol. 125, N 1-2. – P. 373-389.
3. Bactericidal Killing Activities of Cefepime, Ceftazidime, Cefotaxime, and Ceftriaxone against *Staphylococcus aureus* and β -Lactamase-Producing Strains of *Enterobacter aerogenes* and *Klebsiella pneumoniae* in an In Vitro Infection Model / M. Shirley Palmer [et al.] // Antimicrobial Agents And Chemotherapy. – 1995. – Vol. 39, N 8. – P. 1764-1771.
4. Mechanism of penicillin action: Penicillin and substrate bind covalently to the same active site serine in two bacterial D-alanine carboxypeptidases (B-lactam/peptidoglycan/ membrane enzyme/ penicillinase/ acyl enzyme) / R. Rogers Yocum [et al.] // Biochemistry. – 1979. – Vol. 76, N 6. – P. 2730-2734.
5. Blumberg, P. M. Interaction of Penicillin with the Bacterial Cell: Penicillin-Binding Proteins and Penicillin-Sensitive Enzymes / M. Peter Blumberg, L. Jack Strominger // Bacteriological Reviews. – 1974. – Vol. 38, N 3. – P. 291-335.
6. Страчунский, Л. С. Современная антимикробная химиотерапия. Руководство для врачей / под ред. Л. С. Страчунского, С. Н. Козлова. – М.: Боргес, 2002. – 432 с.
7. Livermore, D. M. B-lactams: mode of action and mechanisms of bacterial resistance. In: Lorian V., editor. Antibiotics in laboratory medicine / D. M. Livermore, J. D. Williams. – Baltimore: Williams & Wilkins, 1991. – P. 503-578.
8. Walter, E. Hydrolysis of 3-Acetoxymethyl Cephalosporins by Lysed WholeBlood / E. Walter Wright, A. Judith Frogge // Antimicrobial Agents And Chemotherapy. – 1980. – Vol. 17, N 1. – P. 99-100.

9. Moellering, R. C. The carbapenems: new broad spectrum beta-lactam antibiotics / R. C. Moellering, G. M. Eliopoulos, D. E. Sentochnik // J. Antimicrob. Chemother. – 1989. – Vol. 24. – Suppl. A. – P. 1-7.

10. An investigation of the destruction of the beta-lactam ring of penems by the albumin drug-binding site / H. Bruderlein [et al.] // Can. J. Biochem.– 1981. – Vol. 59 (10). – P. 857-866.

11. Особенности бета-лактамазной активности сыворотки крови больных рожей и пневмонией / И. В. Жильцов [и др.] // Вестник Витебского государственного медицинского университета.– 2009. – Т. 8, № 1. – С. 58-67.

12. Menashi, A. C. A colorimetric procedure for measuring b-lactamase activity / A.C. Menashi, J. Abraham, A. M. Antone Menashi // Analytical Biochemistry. – 1988. – Vol. 168. – P. 252-258.