

83,2% to 4,83%, co-trimoksazole – from 91,1% to 48,39%. The resistance to nalidixic acid appeared (22,58±4,36%). The resistance to III–IV generations cephalosporins and fluoroquinolones (0,84–2,08%) increased. The most effective antibacterial preparation in children at early age with salmonellosis is nalidixic acid. The reserve medicine can be used azytromycin, co-trimoksazole and III generation cephalosporins.

Key words: salmonellosis, nalidixic acid, azytromycin, co-trimoksazole, III generation cephalosporins

УДК 616.9:616-092.19: 616-097

Клинические особенности бета-лактамазной активности сыворотки крови человека

**И.В. ЖИЛЬЦОВ, И.С. ВЕРЕМЕЙ, В.М. СЕМЕНОВ,
И.И. ГЕНЕРАЛОВ, С.К. ЕГОРОВ**

В настоящем исследовании продемонстрировано, что сыворотка крови всех больных и здоровых лиц характеризуется наличием определенного уровня бета-лактамазной активности; средний уровень указанной активности составляет 61,2% (95% ДИ: 60,3...62,1), значения данного признака изменяются в диапазоне от 0 до 99,2%. Наблюдается последовательное снижение средних показателей бета-лактамазной активности сыворотки крови в следующем порядке: практически здоровые военнослужащие > больные с различной травматологической патологией > больные аденовирусной инфекцией > больные с острым гнойным тонзиллитом > больные эпидемическим гриппом А (H1N1) > больные с бактериальными пневмониями > больные туберкулезом легких > больные с вирусными менингитами > больные рожистым воспалением > больные с бактериальными менингитами. Сывороточная бета-лактамазная активность у молодых и здоровых лиц значимо выше, чем у больных, а у них, в свою очередь, снижается по мере нарастания тяжести течения и продолжительности заболевания, ввиду чего низкий уровень сывороточной бета-лактамазной активности может служить значимым ($p < 0,001$) независимым прогностическим фактором тяжелого и/или затяжного течения инфекционных заболеваний. Бета-лактамазная активность сыворотки крови не является ответом организма на воздействие бета-лактаманых антибиотиков. Применение факторного анализа позволяет выделить группу лиц с тяжелым течением патологического процесса, значительной продолжительностью антибактериальной терапии, частой сменой антибиотиков, нередко назначением антибактериальных препаратов резерва всех групп и высоким уровнем бета-лактамазной активности сыворотки крови.

Ключевые слова. Антибиотики бета-лактаманого ряда, антибиотикорезистентность, сыворотка крови, бета-лактамазная активность, инфекционные заболевания

Устойчивость бактерий к бета-лактамным антибиотикам и ингибиторам бета-лактамаз – непрерывно растущая проблема [1]. Вплоть до настоящего времени данный феномен рассматривался лишь как разновидность приспособительной реакции микроорганизмов. Традиционно не принимается во внимание, что человеческий организм, со своей стороны, также небезразличен к введению антибиотиков. Антибиотики, и в том числе бета-лактамы, являются для макроорганизма чужеродными веществами, от которых он стремится освободиться, используя для этого разнообразные механизмы. Так, показано, что у человека отсутствуют ферменты – аналоги бета-лактамаз [2], но гемолизирующая кровь может разрушать некоторые цефалоспорины (цефалотин, цефотаксим) посредством деацетиляции 3-ацетоксиметильной группы [3]. Помимо этого, давно известно, что имипенем разрушается почечными дегидропептидазами; именно поэтому в состав коммерческого препарата имипенема был введен их ингибитор циластатин [4]. Также показано, что отдельные карбапенемы (в частности, 2-метилпенем-3-карбоксихлорид) разрушаются альбумином человеческой крови, причем ее глобулиновая фракция подобной активностью не обладает [5].

Вообще, феномен собственной бета-лактамазной активности человеческой крови известен достаточно давно. Так, в 1972 г. группа исследователей компании Glaxo Research Ltd, изучая свойства недавно синтезированного антибиотика нитроцефина, описала значимый распад бета-лактамной связи последнего под воздействием, в числе прочего, сыворотки человеческой крови, причем было показано, что данное ее свойство опосредуется в первую очередь альбуминовой фракцией [6]. Тем не менее, углубленное исследование данного феномена на тот момент не производилось, реакция была сочтена неспецифической, и обнаруженное явление было забыто на много лет. В 1994 г. научный коллектив во главе с В. Nerli повторно описал феномен интенсивного распада нитроцефина под воздействием человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) [7, 8]. Попытка выявить распад некоторых других антибиотиков цефалоспоринового ряда (в частности, цефтриаксона, цефоперазона и цефсулодина) под воздействием ЧСА не увенчалась успехом, и в результате феномен необычно высокой собственной бета-лактамазной активности человеческой крови остался незамеченным научным сообществом. В 2007 г. явление необычно интенсивного распада нитроцефина под воздействием сыворотки человеческой крови было независимо от других исследователей обнаружено нашим научным коллективом [9].

Природа собственной бета-лактамазной активности сыворотки крови никогда ранее детально не изучалась: до сих пор неизвестны особенности данной активности, ее механизм, а также возможное клиническое значение. Существует предположение, что бета-лактамазная активность сыво-

ротки крови индуцибельна (т.е. является специфическим ответом организма на введение бета-лактамов) и в значительной мере опосредуется поликлональными иммуноглобулинами, обладающими бета-лактамазной активностью, т. наз. абзимами [10]. Наши собственные исследования ранее впервые продемонстрировали феномен наличия антител с пенициллиназной активностью у людей *in vivo* при шигеллезах [11, 12].

Соответственно, **целью настоящего исследования** было уточнить природу бета-лактамазной активности сыворотки крови и установить ее возможное клиническое значение.

Материалы и методы

Проведенное нами клиническое исследование имело «срезовой» (*cross-sectional*) дизайн: изучаемый признак – бета-лактамазная активность сыворотки крови – оценивался одновременно и однократно у всех больных и здоровых лиц, входящих в анализируемые подгруппы. Кроме того, исследование основывалось на пассивном наблюдении за динамикой развития заболевания и эффективностью проводимой антибактериальной терапии (т. наз. *observational design*), поскольку никаких тестовых вмешательств, в том числе смены и модификации проводимой терапии, не производилось. Исследование являлось проспективным. Планирование исследования было выполнено в соответствии с действующими международными стандартами доказательной медицины. В дизайне исследования была предусмотрена контрольная группа. Размер изучаемой выборки определялся в соответствии с общепринятыми рекомендациями [13]. Рассчитанный минимальный размер отдельной группы составляет 40 человек при мощности исследования 0,8 и 53 человека при мощности исследования 0,9. Именно на эти цифры и ориентировались исследователи. Формирование опытных групп осуществлялось методом сплошного последовательного включения всех подходящих больных по мере их поступления до достижения заранее определенного размера групп. Поскольку данное исследование не являлось рандомизированным клиническим испытанием, при распределении больных в опытные и контрольные группы рандомизация не производилась.

Общее количество учтенных случаев составило 501. В число указанных лиц вошли: 53 больных рожистым воспалением, 62 больных бактериальными пневмониями, 51 больной аденовирусной инфекцией (АВИ), 19 больных менингитами (9 – вирусными и 10 – бактериальными), 78 больных острым гнойным тонзиллитом, 32 больных эпидемическим гриппом А (H1N1); в качестве группы сравнения №1 (больные с неинфекционными заболеваниями) – 61 пациент с травмами различной степени тяжести; в качестве группы сравнения №2 (больные, страдающие от тяжелой

инфекционной патологии, но не получающие бета-лактамы антибиотики) – 63 больных туберкулезом легких; в качестве контрольной группы – 82 практически здоровых военнослужащих, проходящих срочную службу в Витебской воздушно-десантной мобильной бригаде. Диагностика заболеваний осуществлялась в соответствии с протоколами диагностики и лечения инфекционных заболеваний, утвержденными Министерством здравоохранения Республики Беларусь (приказ МЗ РБ №484 от 13.06.2006 г.).

Сыворотка крови больных и здоровых лиц была получена центрифугированием цельной свежеполученной крови при 3000 об/мин в течение 15 минут.

Для определения и количественной оценки бета-лактамазной активности сыворотки крови мы применили хроматографическую методику, основанную на изменении окраски антибиотика цефалоспоринового ряда нитроцефина при распаде его бета-лактамной связи [6]. Для проведения экспериментов использовали химически чистый нитроцефин производства Calbiochem. Бета-лактамазная активность оценивалась в % распада стандартного количества нитроцефина, вносимого в пробу.

Статистический анализ результатов исследования производился при помощи программ Statistica 8, SPSS 19 и MedCalc 10.2.

Результаты исследований и их обсуждение

У всех больных в изученных группах был выявлен ненулевой уровень собственной бета-лактамазной активности сыворотки крови. Средний уровень указанной активности вместе с показателями разброса значений (дисперсии) данного признака для каждой из групп больных и здоровых лиц, включенных в настоящее исследование, приведен в таблице.

Как видно из таблицы, средний уровень бета-лактамазной активности в большинстве рассматриваемых групп достаточно близок, но разброс отдельных значений при этом весьма велик; при этом наиболее типичные значения активности лежат в интервале 55–65% распада внесенного в пробу нитроцефина. Имеет место последовательное снижение средних уровней бета-лактамазной активности сыворотки крови в следующем порядке: практически здоровые военнослужащие > больные с травматологической патологией > больные АВИ > больные острым гнойным тонзиллитом > больные эпидемическим гриппом А (H1N1) > больные бактериальными пневмониями > больные туберкулезом легких > больные вирусными менингитами > больные рожей > больные бактериальными менингитами.

Корреляционный анализ показал наличие статистически значимых корреляций между уровнем бета-лактамазной активности сыворотки крови и рядом показателей, характеризующих течение изучаемых заболеваний и особенности проводимой антибактериальной терапии. При этом наблюдаемые корреляции

**Показатели среднего уровня и разброса значений
бета-лактамазной активности сыворотки крови
в исследуемой выборке больных и здоровых лиц**

Группа*	n	M	95% ДИ	min	max	25%	Me	75%
1	53	52,3	49,2...55,5	20,9	71,7	46,6	54,9	61,1
2	62	55,9	53,0...58,8	0,0	66,6	55,8	59,5	61,4
3	51	62,9	61,5...64,2	53,1	71,5	59,4	62,8	66,1
4	9	63,6	60,3...67,0	57,1	69,9	60,2	64,6	65,2
5	10	51,6	40,7...62,5	19,6	66,6	38,8	57,9	63,0
6	78	61,1	59,6...62,6	43,7	96,7	57,6	61,2	64,3
7	61	60,1	58,7...61,6	45,1	70,0	56,4	59,7	64,5
8	63	66,0	64,2...67,8	42,7	99,2	63,4	65,6	68,6
9	32	54,3	50,2...58,3	26,7	70,9	49,1	56,7	62,3
10	82	70,5	68,8...72,3	40,4	90,1	67,1	71,9	75,5
Всего	501	61,2	60,3...62,1	0,0	99,2	57,1	62,1	66,8

* 1 – группа больных рожистым воспалением, 2 – бактериальными пневмониями, 3 – аденовирусной инфекцией, 4 – вирусными менингитами, 5 – бактериальными менингитами, 6 – острым гнойным тонзиллитом, 7 – эпидемическим гриппом А (H1N1), 8 – травматологической патологией, 9 – туберкулезом легких, 10 – практически здоровые военнослужащие. M – среднее арифметическое, Me – медиана.

в основном слабые ($|R|=0,12... 0,32$), но статистически высокозначимые (в большинстве случаев $p<0,0001$). Согласно данному анализу, высокая бета-лактамазная активность сыворотки крови соответствует легкому течению инфекционных болезней либо полному здоровью, причем при вирусных инфекциях она выше, чем при бактериальных; в то же время, низкий уровень сывороточной бета-лактамазной активности с большой определенностью соответствует тяжелому течению бактериальных инфекций. Указанное заключение подтверждается данными ROC-анализа, согласно которым, уровень бета-лактамазной активности сыворотки крови более 49,7% предсказывает продолжительность госпитализации больного менее 9 суток с чувствительностью 100% и специфичностью 86,5% ($p<0,0001$). При помощи ROC-анализа показано также, что уровень сывороточной бета-лактамазной активности может служить значимым ($p<0,001$) прогностическим фактором тяжелого и/или затяжного течения вышеперечисленных инфекционных заболеваний. Так, при уровне активности менее 47,07% продолжительность лихорадочного периода у больных составляет более 10 суток (чувствительность 77%, специфичность 91,6%), а менее 41,8% – более 15 суток (чувствительность 100%, специфичность 94,1%). Обратно вышесказанному, уровень бета-лактамазной активности крови выше 64,6%

предсказывает наличие полного здоровья у испытуемого с чувствительностью 85,4% и специфичностью 96,0% ($p < 0,0001$).

Анализ клинико-лабораторных данных не вносит ясность в природу бета-лактамазной активности сыворотки крови. Тем не менее, очевидно, что бета-лактамазная активность сыворотки крови не является ответом организма на введение бета-лактамных антибиотиков, т.к. ее уровень снижается с возрастом (в противном случае наблюдалась бы обратная тенденция). Более того, уровень активности ниже при тяжелом течении бактериальных инфекций, когда больной, как правило, получает больше бета-лактамных антибиотиков и в более высоких дозах. Складывается впечатление, что уровень бета-лактамазной активности сыворотки крови является индивидуальным признаком, зависящим от состояния и особенностей конкретного организма; он медленно снижается с течением жизни и быстро – при тяжелых инфекционных заболеваниях; антибиотики бета-лактамной группы определенно не являются индукторами бета-лактамазной активности сыворотки крови.

Факторный анализ показал, что анализируемая выборка отчетливо подразделяется на группы:

1) лиц с нетяжелым или среднетяжелым течением инфекционных заболеваний и нечастой сменой антибактериальной терапии;

2) лиц с тяжелым течением патологического процесса, значительной продолжительностью антибактериальной терапии, частой сменой антибиотиков и нередким назначением антибактериальных препаратов резерва всех групп. Можно предположить, что высокий уровень бета-лактамазной активности крови у таких больных будет препятствовать успешному лечению, снижая эффективность назначаемых им антибактериальных препаратов бета-лактамного ряда.

Выводы

1. Сыворотка крови всех обследованных больных и здоровых лиц характеризуется наличием определенного уровня бета-лактамазной активности; средний уровень указанной активности составляет 61,2% распада внесенного в пробу стандартного количества нитроцефина (95% ДИ: 60,3...62,1);

2. Наблюдается последовательное снижение средних показателей бета-лактамазной активности сыворотки крови в следующем порядке: практически здоровые военнослужащие > больные с травматологической патологией > больные аденовирусной инфекцией > больные острым гнойным тонзиллитом > больные эпидемическим гриппом А (H1N1) > больные с бактериальными пневмониями > больные туберкулезом легких > больные с вирусными менингитами > больные рожистым воспалением > больные с бактериальными менингитами;

3. Высокая бета-лактамазная активность сыворотки крови скорее соответствует вирусным заболеваниям, чем бактериальным; низкий уровень бета-лактамазной активности с большой определенностью соответствует тяжелому течению бактериальных инфекций;

4. Бета-лактамазная активность сыворотки крови не является ответом организма на введение бета-лактаменных антибиотиков. Вероятнее всего, уровень сывороточной бета-лактамазной активности является индивидуальным признаком, зависящим от состояния и особенностей конкретного организма; он медленно снижается с течением жизни и быстро – при тяжелых инфекционных заболеваниях;

5. Низкий уровень сывороточной бета-лактамазной активности может служить значимым ($p < 0,001$) независимым прогностическим фактором тяжелого и/или затяжного течения инфекционных заболеваний.

Литература

1. Helfand M.S. Beta-lactamases: a survey of protein diversity / M.S. Helfand, R.A. Bonomo // *Curr. Drug Targets. Infect. Disord.* – 2003. – Vol. 3, № 1. – P. 9–23.

2. Catalytic mechanism of an abzyme displaying a beta-lactamase-like activity / B. Avalle [et al.] // *Appl. Biochem. Biotechnol.* – 2000. – Vol. 83, № 1–3. – P. 163–169.

3. Walter E. Wright Hydrolysis of 3-Acetoxyethyl Cephalosporins by Lysed Whole Blood / Walter E. Wright, Judith A. Frogge // *Antimicrobial Agents And Chemotherapy.* – 1980. – Vol. 17, № 1. – P. 99–100.

4. 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.

5. 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.

6. Novel method for detection of b-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate / H.C. Callaghan [et al.] // *Antimicrobial agents and chemotherapy.* – 1972. – Vol. 1, № 4. – P. 283–288.

7. Nerli B. An unknown hydrolase activity of human serum albumin: beta-lactamase activity / B. Nerli, F. García, G. Picó // *Biochem. Mol. Biol. Int.* – 1995. – Vol. 37, № 5. – P. 909–915.

8. Nerli B. Evidence of human serum albumin beta-lactamase activity / B. Nerli, G. Picó // *Biochem. Mol. Biol. Int.* – 1994. – Vol. 32, № 4. – P. 789–795.

9. Необычно высокий уровень распада антибиотиков бета-лактаманной группы в человеческой плазме и сыворотке крови / И.В. Жильцов [и др.] // *Материалы Евро-Азиатского Конгресса по инфекционным болезням.* – Витебск, 2008. – Том 1. – С. 85–86.

10. Jerne N.K. Towards a network theory of the immune system / N.K. Jerne / *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur).* – 1974. – Vol. 125, № 1–2. – P. 373–389.

11. Жильцов И.В. Выявление абзимов с пенициллиназной активностью в сыворотке крови больных шигеллезами / И.В. Жильцов, И.И. Генералов, В.М. Семенов // *Имунопатология, аллергология, инфектология.* – 2004. – № 3 – С. 90–93.

12. Особенности «биологической» антибиотикоустойчивости при шигеллезах: выявление in vivo поликлональных IgG, обладающих пенициллиназной активностью / И.В. Жильцов [и др.] // Медицинская панорама. – 2006. – № 5, Том 62. – С. 46–48.

13. Giesecke J. Modern infectious disease epidemiology, second edition / J. Giesecke // Publishing House «Hodder Arnold». – 2002. – P. 224–226.

Клінічні особливості бета-лактамазної активності сироватки крові людини

**І.В. ЖИЛЬЦОВ, І.С. ВЕРЕМЕЙ, В.М. СЕМЕНОВ,
І.І. ГЕНЕРАЛОВ, С.К. ЄГОРОВ**

У цьому дослідженні продемонстровано, що сироватка крові всіх хворих і здорових осіб характеризується наявністю певного рівня бета-лактамазної активності; середній рівень зазначеної активності становить 61,2% (95% ДІ: 60,3...62,1), значення даної ознаки змінюються в діапазоні від 0 до 99,2%. Спостерігається послідовне зниження середніх показників бета-лактамазної активності сироватки крові в наступному порядку: практично здорові військовослужбовці > хворі з різною патологією травматологічної > хворі аденовірусної інфекцією > хворі з гострим гнійним тонзилітом > хворі епідемічним грипом А (H1N1) > хворі з бактеріальними пневмоніями > хворі на туберкульоз легких > хворі з вірусними менінгітами > хворі бешиховим запаленням > хворі з бактеріальними менінгітами. Сироваткова бета-лактамазна активність у молодих і здорових осіб значимо вище, ніж у хворих, а у них, у свою чергу, знижується в міру наростання тяжкості перебігу та тривалості захворювання, через що низький рівень сироваткової бета-лактамазної активності може служити значущим ($p < 0,001$) незалежним прогностичним фактором важкого та / або затяжного перебігу інфекційних захворювань. Бета-лактамазна активність сироватки крові не є відповіддю організму на вплив бета-лактамних антибіотиків. Застосування факторного аналізу дозволяє виділити групу осіб з важким перебігом патологічного процесу, значною тривалістю антибактеріальної терапії, частотою зміною антибіотиків, нерідко призначенням антибактеріальних препаратів резерву всіх груп і високим рівнем бета-лактамазної активності сироватки крові.

Ключові слова. Антибіотики бета-лактамного ряду, антибіотикорезистентності, сироватка крові, бета-лактамазна активність, інфекційні захворювання

Clinical qualities of beta-lactamase activity of human blood serum

**I. ZHILTSOV, I. VEREMEY, V. SEMENOV,
I. GENERALOV, S. YEGOROV**

In the present study we have demonstrated that blood serum of all sick and healthy individuals is characterized by a certain level of beta-lactamase activity. An average level of this activity was 61,2% (95% CI: 60,3...62,1), and values of this factor varied within 0–99,2%. We observed consecutive decrease of average values of blood serum beta-lactamase activity in the following order: healthy conscripts > traumatic pathology patients > adenoviral infection patients > acute purulent tonsillitis patients > patients with pandemic flu (H1N1, or «swine») > bacterial pneumonia patients > patients with pulmonary tuberculosis

> patients with viral meningitis > erysipelas patients > patients with bacterial meningitis. Serum beta-lactamase activity in young and healthy persons is considerably higher than in sick individuals; in turn, this activity decreases in patients alongside with increase of disease severity and duration; thus, low level of serum beta-lactamase activity may be used as reliable ($p < 0,001$) independent prognostic factor of severe and/or propagated course of infectious diseases. Beta-lactamase activity of blood serum isn't a response of organism towards the exposure to beta-lactam antibiotics. Factor analysis enabled us to reveal the group of patients with severe course of pathologic processes accompanied by significant duration of antibacterial therapy, frequent replacement of antibiotics and frequent prescription of the reserve antibacterial preparations of all available groups, who had high level of beta-lactamase activity of blood serum.

Key words. *Beta-lactam antibiotics, antibiotic resistance, human blood serum, beta-lactamase activity, infectious diseases*

УДК 616-03:616-035.2

**Распад некоторых бета-лактамовых антибиотиков
под воздействием нативной сыворотки крови
и человеческого сывороточного альбумина**

**И.В. ЖИЛЬЦОВ, Д.В. МОИСЕЕВ,
В.М. СЕМЕНОВ, С.К. ЕГОРОВ**

*Витебский государственный медицинский университет,
Республика Беларусь*

Настоящая работа посвящена исследованию влияния ЧСА на бета-лактамы. Показано, что гидролиз четырех антибиотиков бета-лактамового ряда (бензилпенициллина, цефалексина, азтреонама и имипенема) под воздействием ЧСА статистически значительно ускоряется, что обуславливает дополнительный распад 2,3% азтреонама, 7,5% бензилпенициллина, 10,8% цефалексина и 11,9% имипенема к шестому часу инкубации при 37°C. При этом вид кинетических кривых распада бензилпенициллина, цефалексина и имипенема под воздействием ЧСА характерен для ферментативных реакций 1-го порядка, а азтреонама – нулевого порядка. Повышение температуры инкубации с 37°C до 39°C приводит к ускорению катализируемого альбумином распада имипенема в среднем на 14,0%, а цефалексина – на 15,7%. Бета-лактамовые антибиотики, не разрушающиеся под воздействием ЧСА, не разрушаются и цельной сывороткой крови. По отношению к бета-лактамовым антибиотикам, разрушаемым ЧСА, нативная сыворотка крови в некоторых случаях может проявлять существенно более высокую (для бензилпенициллина разница может превышать 30%) бета-лактамазную активность, чем очищенные препараты альбумина любого происхождения в нормальной для челове-