

## КЛИНИКО-ПАТОГЕНЕТИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ БЕТА-ЛАКТАМАЗНОЙ АКТИВНОСТИ СЫВОРОТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ И ЗДОРОВЫХ ЛИЦ

УО «Витебский государственный медицинский университет»

В настоящем исследовании показано, что сыворотка крови всех больных и здоровых лиц характеризуется наличием определенного уровня бета-лактамазной активности; средний уровень указанной активности составляет 61,2%. 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, вследствие 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-лактамов антибиотиков. Применение факторного анализа позволяет выделить группу лиц с тяжелым течением патологического процесса, значительной продолжительностью антибактериальной терапии, частой сменой антибиотиков, нередким назначением антибактериальных препаратов резерва всех групп и высоким уровнем бета-лактамазной активности сыворотки крови.

**Ключевые слова:** бета-лактамы антибиотиков, бета-лактамазная активность.

**I.V. Zheltsov, I.S. Veremey, V.M. Semenov, S.M. Logvinenko**

### CLINICAL AND PATHOGENETIC SIGNIFICANCE OF BETA-LACTAMASE ACTIVITY OF SERUM FROM PATIENTS AND HEALTHY INDIVIDUALS

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

Устойчивость бактерий к бета-лактамам антибиотикам и ингибиторам бета-лактамаз – непрерывно растущая проблема [3]. Вероятно, именно поэтому вплоть до настоящего времени антибиотикоустойчивость рассматривалась лишь как приспособительная реакция микроорганизмов. При этом исследователи и клиницисты традиционно не принимают 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.

Вообще, феномен собственной бета-лактамазной активности человеческой крови известен достаточно давно. Так, в 1972 г. группа исследователей из Glaxo Research Ltd, изучая свойства недавно

синтезированного ими хромогенного цефалоспори- на нитроцефина, описала значимый распад бета- лактамной связи указанного антибиотика под воз- действием, в числе прочего, сыворотки человечес- кой крови, причем было показано, что данное ее свойство опосредуется в первую очередь альбуми- новой фракцией [6]. Углубленное исследование дан- ного феномена на тот момент не производилось, ре- акция была сочтена неспецифической, и обнаружен- ное явление было забыто на много лет. В 1994 г. научный коллектив во главе с Nerli повторно опи- сал феномен интенсивного распада нитроцефина под воздействием человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) [4, 5]. Попытка выявить распад некоторых других антибиотиков цефалоспориново- го ряда (в частности, цефтриаксона, цефоперазона и цефсулодина) под воздействием ЧСА не увенча- лась успехом, и в результате феномен необычно высокой собственной бета-лактамазной активнос- ти человеческой крови остался незамеченным на- учным сообществом. В 2007 г. явление интенсив- ного распада нитроцефина под воздействием сы- воротки человеческой крови было независимо от других исследователей было обнаружено нашим на- учным коллективом [2]. Природа собственной бета- лактамазной активности сыворотки крови никогда и никем подробно не изучалась. Соответственно, **целью** настоящего исследования было уточнить при- роду бета-лактамазной активности сыворотки кро- ви и установить ее возможное клиническое значе- ние.

### Материал и методы

Проведенное нами клиническое исследование имело «срезовой» (cross-sectional) дизайн. Никаких тестовых вмешательств, в том числе смены и моди- фикации проводимой терапии, не производилось.

**Таблица 1 – Показатели среднего уровня и разброса значений бета-лактамазной ак- тивности сыворотки крови в различных группах исследуемой выборки**

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

\* Примечание: 1 – группа больных рожистым воспалением, 2 – бактериальными пневмо- ниями, 3 – аденовирусной инфекцией, 4 – вирусными менингитами, 5 – бактериальными менингитами, 6 – острым гнойным тонзиллитом, 7 – эпидемическим гриппом А (H1N1), 8 – различной травматологической патологией, 9 – туберкулезом легких, 10 – практически здо- ровые военнослужащие. M – среднее арифметическое, Me – медиана.

Исследование являлось проспективным. Планиро- вание исследования было выполнено в соответ- ствии с действующими международными рекомен- дациями, утверждающими стандарты доказатель- ной медицины [1]. В дизайне исследования была предусмотрена контрольная группа, составленная из 82 практически здоровых солдат срочной служ- бы, проходящих военную службу в Витебской воз- душно-десантной мобильной бригаде.

Общее количество учтенных случаев, пригодных для статистической обработки, составило 501. В число указанных лиц вошли: 1) 53 больных рожис- тым воспалением; 2) 62 больных бактериальными пневмониями; 3) 51 больной аденовирусной инфек- цией (АВИ); 4) 19 больных менингитами (9 – вирус- ными и 10 – бактериальными); 5) 78 больных ост- рым гнойным тонзиллитом; 6) 32 больных эпиде- мическим гриппом А (H1N1), т.н. «свиным»; 7) груп- па сравнения №1 (больные с неинфекционными заболеваниями) – 61 пациент с травмами различ- ной степени тяжести; 8) группа сравнения №2 (боль- ные, страдающие от тяжелой инфекционной пато- логии, но не получающие бета-лактамы антибио- тики) – 63 больных туберкулезом легких; 9) кон- трольная группа – 82 практически здоровых воен- нослужащих срочной службы из состава Витебской воздушно-десантной мобильной бригады.

Для определения и количественной оценки бета- лактамазной активности сыворотки крови мы ис- пользовали хроматографическую методику, осно- ванную на изменении окраски синтетического ан- тибактериального цефалоспоринового ряда нитроцефина при распаде его бета-лактаманной связи. При этом окраска реакционной смеси меняется с желтой на красно-оранжевую [6]. Бета-лактамазная актив- ность оценивалась в % распада стандартного коли-

чества нитроце-фина, вносимого в пробу.

Статистический анализ результатов исследова- ния производился при помощи аналитичес- ких пакетов Statistica 8.0, SPSS 19 и MedCalc 10.2 (только ROC-ана- лиз). В качестве показателей центральной тенден- ции значений изучаемых при- знаков использо- вали среднее арифметическое (M) и/или меди- ну (Me) с указа- нием 95% дове-

рительно интервала. При необходимости охарактеризовать разброс значений какого-либо признака указывали его минимальное и максимальное значения, а также первый и третий квартили. Уровень достоверности нулевой гипотезы ( $p$ ) для принятия решения о значимости полученных результатов во всех тестах был принят равным или менее 0,05. Для выявления корреляционных взаимосвязей мы использовали метод ранговых корреляций Спирмена, для подтверждения достоверности различий изучаемых признаков в независимых выборках –  $U$ -тест Манна-Уитни или медианный тест (при попарном сравнении переменных) либо дисперсионный анализ Краскела-Уоллеса (при одновременном сравнении переменных в 3 и более выборках).

### Результаты

У всех больных в изученных группах был выявлен тот или иной ненулевой уровень собственной бета-лактамазной активности сыворотки крови. Средний уровень указанной активности вместе с показателями разброса значений 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 лежит в интервале 55-65% распада внесенного в пробу нитроцефина. Можно отметить преобладание уровня бета-лактамазной активности в группе практически здоровых военнослужащих над прочими группами, сравнительно низкий уровень активности в группе больных бактериальными менингитами, значительную дисперсию значений активности в группах больных рожистым воспалением, пневмониями, бактериальными менингитами и туберкулезом легких, и в то же время – незначительный разброс значений активности в группах больных АВИ, острым гнойным тонзиллитом, эпидемическим гриппом А и, в особенности, вирусными менингитами.

Наибольшая бета-лактамазная активность сыворотки крови наблюдалась в группе здоровых военнослужащих – она оказалась значимо выше, чем во всех остальных группах больных, включенных в настоящее исследование.

Последнее место принадлежит группе больных бактериальными менингитами, чья сывороточная бета-лактамазная активность значимо уступает таковой в группах больных АВИ, вирусными менингитами, травматологической патологией и здоровых военнослужащих, и не отличается от активности во всех остальных обследованных группах.

Средние уровни бета-лактамазной активности во всех остальных группах находятся в интервале между вышеуказанными – имеет место последовательное снижение бета-лактамазной активности сыворотки крови в следующем порядке: практически здоровые военнослужащие > больные с травматологической патологией > больные АВИ > больные с острым гнойным тонзиллитом > больные эпидемическим гриппом А (H1N1) > больные с бактериаль-

ными пневмониями > больные туберкулезом легких > больные вирусными менингитами > больные рожей > больные бактериальными менингитами. Соответственно, можно предварительно заключить, что бета-лактамазная активность у молодых и здоровых индивидуумов значимо выше, чем у больных, а у них, в свою очередь, снижается по мере нарастания тяжести течения и продолжительности заболевания; при инфекционных заболеваниях бета-лактамазная активность значимо ниже, чем при травматологических.

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. Анализ вышеприведенных корреляционных зависимостей показывает:

1. Уровень сывороточной бета-лактамазной активности обратно пропорционален возрасту лиц, включенных в исследование;

2. Наличие у больного рожи, пневмонии, эпидемического гриппа А приводит к относительному снижению бета-лактамазной активности сыворотки крови, в то время как наличие туберкулеза легких – к повышению; наиболее же высокий уровень активности наблюдается у здоровых военнослужащих;

3. Уровень бета-лактамазной активности обратно коррелирует с клиническими показателями, характеризующими тяжесть течения инфекционных заболеваний – уровнем лихорадки, продолжительностью лихорадочного периода, длительностью госпитализации, наличием тяжелого течения соответствующих болезней; налицо также прямая корреляция с легким течением инфекционных заболеваний;

4. Помимо вышесказанного, существует обратная зависимость между уровнем сывороточной бета-лактамазной активности и рядом лабораторных показателей, характеризующих тяжесть течения инфекционных заболеваний, в частности, уровнями лейкоцитоза, палочкоядерного сдвига, нейтрофилии, СОЭ, и, кроме того, глюкозы и мочевины крови;

5. Выявлен ряд обратных зависимостей между уровнем бета-лактамазной активности крови и характеристиками проводимой больным антибактериальной терапии, в частности, числом ее смен, количеством одновременно назначенных антибиотиков, продолжительностью антибактериальной терапии, фактом назначения и продолжительностью лечения антибиотиками резерва, как относящимися, так и не относящимися к классу бета-лактамов.

При этом наблюдаемые корреляции в основном слабые ( $|R|=0,12... 0,32$ ), но статистически высокозначимые (в большинстве случаев  $p < 0,0001$ ), что доказывает реальность существования выявленных зависимостей.

Можно заключить, что высокая бета-лактамазная активность сыворотки крови скорее сопутству-

ет легкому течению инфекционных заболеваний либо полному здоровью, причем выше при вирусных заболеваниях, чем при бактериальных; в то же время, низкий уровень сывороточной бета-лактамазной активности с большой определенностью соответствует тяжелому течению инфекционных болезней.

Очевидно также, что бета-лактамазная активность сывотки крови не является ответом организма на воздействие бета-лактаманых антибиотиков – 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-лактаманых антибиотиков и в более высоких дозах. Складывается впечатление, что уровень бета-лактамазной активности сывотки крови является индивидуальным признаком, зависящим от состояния и особенностей конкретного организма; он медленно снижается с течением жизни, и быстро – при тяжелых инфекционных заболеваниях).

Если из совокупной выборки выделить подгруппу больных с несомненной бактериальной патологией, гарантированно получавших курс антибактериальной терапии с обязательным присутствием в схеме лечения бета-лактаманых антибиотиков (больные рожистым воспалением, пневмониями и бактериальными менингитами,  $n=125$ ), и провести в этой подгруппе корреляционный анализ, то окажется, что выявляемые при этом закономерности носят тот же характер, с поправкой на уровень значимости, снижающийся пропорционально уменьшению размера анализируемой выборки.

Выявленные нами закономерности подтверждаются результатами ROC-анализа, согласно которым, уровень бета-лактамазной активности сывотки крови более 49,7% предсказывает продолжительность госпитализации больного менее 9 суток с чувствительностью 100% и специфичностью 86,5% ( $p < 0,0001$ ).

Показано также, что уровень сывоточной бета-лактамазной активности может служить значимым ( $p < 0,001$ ) независимым прогностическим фактором тяжелого и/или затяжного течения вышеперечисленных инфекционных заболеваний. Так, при уровне активности менее 47,1% 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% ( $p < 0,0001$ ).

Тем не менее, нельзя не учитывать крайнюю неоднородность анализируемой выборки, которая была составлена из 10 групп, включающих больных с широким спектром инфекционной и неинфекционной патологии, а также практически здоровых лиц. Существует специальный метод статистической

обработки, основанный на анализе корреляционных матриц и предназначенный для вычленения общих группирующих признаков (т.н. «факторов») в изначально неоднородных выборках – т.н. факторный анализ. В результате применения данного метода статистической обработки данных оказалось, что значительная часть (> 60%) анализируемой выборки отчетливо подразделяется на две неодинаковых группы:

1) Группа 1 – лица с различными уровнями бета-лактамазной активности сывотки крови, преимущественно тяжелым течением заболеваний, значительной продолжительностью госпитализации и антибактериальной терапии, большим количеством одновременно назначенных антибиотиков, значительным числом замен схем антибактериальной терапии, частым назначением бета-лактаманых и других антибиотиков резерва;

2) Группа 2 – пациенты с низкими уровнями сывоточной бета-лактамазной активности, легким или среднетяжелым течением заболеваний, небольшой продолжительностью госпитализации и антибактериальной терапии, редкими сменами терапии и эпизодическим назначением антибиотиков резерва всех классов;

Можно предположить, что высокий уровень бета-лактамазной активности крови у больных из первой группы будет препятствовать успешному лечению, снижая эффективность назначаемых им антибактериальных препаратов бета-лактаманого ряда.

### **Выводы**

1. Сывотка 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), значения данного признака изменяются в диапазоне от 0 до 99,2%;

2. Наблюдается последовательное снижение средних показателей бета-лактамазной активности сывотки 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. Сывоточная 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;

3. Бета-лактамазная активность сывотки крови не является ответом организма на воздействие бета-лактаманых антибиотиков;

4. Применение факторного анализа выявляет наличие в анализируемой выборке подгруппы больных с тяжелым течением патологического процес-

са, значительной продолжительностью антибактериальной терапии, частой сменой антибиотиков, нередким назначением антибактериальных препаратов резерва всех групп и высоким уровнем бета-лактамазной активности. Можно предположить, что высокий уровень бета-лактамазной активности крови у таких больных будет снижать эффективность назначенных им бета-лактамов;

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. Жильцов, И.В. Дизайн биомедицинских исследований / И.В. Жильцов, В.М. Семенов // Витебск, издательский отдел УО ВГМУ. – 2010. – 93 с.

2. 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.

3. 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.

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

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

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.

*Поступила 6.10.2011 г.*