

© ЗАНЬКО А.С., СЕМЕНОВ Д.М., 2015
УДК 618.346-008.831-074:615.33.036.8

ОСОБЕННОСТИ СОБСТВЕННОЙ β -ЛАКТАМАЗНОЙ АКТИВНОСТИ В ОКОЛОПЛОДНЫХ ВОДАХ

Занько А.С.¹, Семенов Д.М.²

¹УЗ «Витебский городской родильный дом № 2», 210017, Республика Беларусь, г. Витебск; ²УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», 210023, Республика Беларусь, г. Витебск

Для корреспонденции: Занько Андрей Сергеевич — врач акушер-гинеколог УЗ «Витебский городской родильный дом № 2», zas08021988@gmail.com

В статье приведены результаты исследования уровня собственной β -лактамазной активности околоплодных вод 40 женщин.

Целью исследования стало изучение уровня β -лактамазной активности околоплодных вод у беременных, ее связь с β -лактамазной активностью сыворотки крови и оценка клинического значения биологической резистентности к β -лактамамным антибиотикам у данной группы пациенток.

Материал и методы. Женщины ($n = 40$) были разделены по признакам в зависимости от наличия беременности, срока гестации, наличия воспалительного процесса. β -Лактамазную активность в сыворотке крови обследуемых пациенток определяли с использованием тест-системы Биолактам.

Результаты и обсуждение. У всех пациенток был выявлен тот или иной ненулевой уровень собственной β -лактамазной активности в околоплодных водах и сыворотке крови. Высокий уровень β -лактамазной активности крови у таких пациенток будет препятствовать успешному лечению, снижая эффективность назначенных им антибактериальных препаратов из группы β -лактамов. В свою очередь определение биологической резистентности к β -лактамамным антибиотикам позволяет сократить необоснованное их применение и повысить эффективность лечения.

Ключевые слова: β -лактамы антибиотиков; беременность; биологическая резистентность; Биолактам.

Для цитирования: Архив акушерства и гинекологии им. В.Ф. Снегирева. 2015; 2 (1): 18—21.

BETA-LACTAMASE ACTIVITY IN THE AMNIOTIC FLUID

Zanko A.S.¹, Semyonov D.M.²

¹Vitebsk Municipal Maternity Hospital N 2, Belarus, Vitebsk, 210017; ²Vitebsk State Order Friendship of Peoples Medical University, Belarus, Vitebsk, 210023

Address for correspondence: zas08021988@gmail.com. Zanko A.S.

Beta-lactamase activities were measured in the amniotic fluid and serum of pregnant women. The relationship between the parameters was analyzed and the clinical significance of biological resistance to beta-lactam antibiotics in this patient population was evaluated. A total of 40 women were distributed into groups by the following parameters: pregnancy (pregnant/nonpregnant), gestation term, and inflammatory process (present/not). Serum beta-lactamase activity was measured by the Biolactam test system. All patients exhibited beta-lactamase activities in the amniotic fluid and serum. High level of the blood beta-lactamase activity is a factor preventing effective therapy by beta-lactam antibiotics. Hence, evaluation of biological resistance to beta-lactam antibiotics before therapy prevents their unjustified prescription and improves the treatment efficiency.

Key words: beta-lactam antibiotics; pregnancy; biological resistance; Biolactam.

Citation: Arkhiv Akusherstva i Ginekologii im. V.F. Snegiryova. 2015; 2 (1): 18—21. (in Russ.)

Беременность и лактация — особые периоды в жизни практически каждой женщины. Вполне естественно, что возникающие в эти периоды заболевания, как специфически характерные для беременности, так и экстрагенитальные, требуют медикаментозного лечения. В немалом числе случаев (например, при урогенитальных заболеваниях, гестационном пиелонефрите, осложнениях послеродового периода, а также при большом числе экстрагенитальных инфекционно-воспалительных заболеваний как во время беременности, так и после родов) показана антибактериальная терапия. Антибактериальные препараты — самая сложная для применения группа лекарств, так как она требует

учета не только механизма действия препарата, но и основ клинической микробиологии. При выборе и назначении антибактериального препарата беременной необходимо учитывать его возможное неблагоприятное воздействие на развивающийся плод и новорожденного, что в определенной мере ограничивает перечень антибактериальных препаратов, используемых при беременности и лактации [1].

β -Лактамные антибиотики являются лидерами среди антибактериальных препаратов, которые назначают при беременности. Это обусловлено их относительной безопасностью, хорошей переносимостью и широким спектром действия. Очень важно, чтобы данные пре-

параты давали максимальный эффект. Достижение необходимого результата (уничтожение бактериального агента) возможно при соблюдении нескольких условий. Во-первых, следует правильно подобрать препарат в необходимой дозировке. Антибиотик подбирают в соответствии с нозологией заболевания и чувствительностью бактериального агента к данному препарату. Во-вторых, пациент должен соблюдать режим приема антибиотика. И, в-третьих, необходимо учитывать β -лактамазную резистентность как макро-, так и микроорганизма. На выполнение последнего условия нельзя повлиять, однако можно своевременно поменять препарат.

Способность к продукции разных типов β -лактамаз в различных концентрациях была выявлена у множества бактерий, как грамположительных, так и, в особенности, грамотрицательных. Вплоть до настоящего времени антибиотикоустойчивость болезнетворных бактерий рассматривалась лишь как приспособительная реакция микроорганизмов. При этом исследователи и клиницисты традиционно не принимают во внимание, что организм человека со своей стороны также небезразличен к введению антибиотиков. Антибиотики являются для макроорганизма чужеродными веществами, от которых он стремится освободиться, используя для этого разнообразные механизмы [2].

Феномен собственной β -лактамазной активности человеческой крови известен достаточно давно. Однако его клиническое значение не исследовали, и в результате это явление осталось незамеченным научным сообществом [3]. К основным факторам собственной β -лактамазной активности человеческой крови можно отнести воздействие на молекулы антибактериального препарата человеческого сывороточного альбумина (ЧСА). Помимо ЧСА, большинство белковых фракций крови обладает β -лактамазной активностью, составляющей приблизительно 9,6% от общей сывороточной. Собственной β -лактамазной активностью обладают также и поликлональные IgG [3, 4].

Особняком стоит феномен формирования в человеческом организме иммуноглобулинов, обладающих β -лактамазной активностью, так называемых абзимов (каталитических антител). Эти каталитические антитела формируются в организме в естественных условиях как одно из звеньев иммунологической сети Ерне (так называемые антитела второго порядка). Согласно данной теории, при попадании любого антигена в организм к нему образуются антитела первого порядка [6]. Такие антитела способны специфически связывать соответствующий антиген. В целом это приводит к тому, что в организме образуются (в большем или меньшем количестве) антитела практически ко всем антигенным детерминантам внедрившегося антигена. В случае, если антиген представляет собой фермент, в числе прочих образовавшихся к нему антител неизбежно окажутся антитела к активному центру фермента. Далее к связывающим сайтам антител первого порядка образуются антитела второго порядка. Ввиду этого связывающий сайт антитела второго порядка будет до из-

вестной степени структурно подобен исходному антигену. Таким образом, если антигенной детерминантой для формирования антитела первого порядка послужил активный центр фермента, то связывающий центр антитела второго порядка будет представлять собой структурный аналог активного центра исходного фермента. В итоге можно ожидать, что антитело второго порядка будет способно проявлять соответствующую ферментативную активность. При этом выраженность данной активности будет зависеть от того, насколько более точным структурным аналогом активного центра исходного фермента будет являться связывающий участок антитела второго порядка [2].

С учетом вышеперечисленного появляются новые подходы к объяснению некоторых наблюдаемых в клинике феноменов. Так, при ряде инфекционных заболеваний описана клиническая (т.е. *in vivo*) неэффективность различных β -лактаменных антибиотиков, которые *in vitro* эффективно подавляли жизнедеятельность возбудителей соответствующих заболеваний. Данное явление может объясняться как особенностями локализации возбудителей в организме человека и фармакокинетикой конкретных антибактериальных препаратов, так и наличием в крови больного значительного титра каталитических антител, способных эффективно гидролизовать соответствующие антибиотики [2, 5].

Клиническая значимость феномена высокой β -лактамазной активности сыворотки крови установлена в ряде независимых исследований, однако в доступной литературе отсутствуют сведения об изучении данного феномена при беременности, что требует дальнейшего изучения.

Во время беременности в женском организме появляется еще одна среда — амниотическая жидкость. Высокая β -лактамазная активность амниотической жидкости может быть связана с проникновением и размножением в ней *S. aureus*, гемофилов или энтеробактерий, способных продуцировать β -лактамазы. В околоплодных водах содержатся некоторое количество альбумина и иммуноглобулины, основной источник которых — сыворотка крови матери, что в свою очередь может обуславливать собственную β -лактамазную активность околоплодных вод. Феномен β -лактамазной активности околоплодных вод может иметь важное клиническое значение при выборе антибактериальных препаратов в лечении внутриутробных бактериальных инфекций и определять тактику ведения неонатального периода.

Целью исследования стало изучение уровня β -лактамазной активности околоплодных вод у беременных, ее связь с β -лактамазной активностью сыворотки крови и оценка клинического значения биологической резистентности к β -лактаменным антибиотикам у данной группы пациенток.

Материал и методы

Исследованы образцы околоплодных вод 40 женщин на сроке беременности 36—42 нед, находившихся на стационарном лечении в Витебском городском

Показатели среднего уровня собственной β-лактамазной активности сыворотки крови и околоплодных вод у пациенток исследуемой выборки

Показатель	<i>n</i>	<i>M</i>	95% ДИ	min	max	<i>Me</i>	Lower Quartile	Upper Quartile
Уровень β-лактамазной активности сыворотки крови	40	57,39	51,97...62,8	40,4	71,1	57,2	42,8	69,1
Уровень β-лактамазной активности околоплодных вод	40	33,58	23,37...43,79	11,88	101,0	25,38	19,85	36,43

клиническом роддоме № 2 с 01.10.12 по 01.05.13. У всех женщин также была определена собственная (так называемая биологическая) β-лактамазная активность сыворотки крови.

Забор проб околоплодных вод осуществляли при проведении операций кесарева сечения. Собранные пробы хранили при –20 °С при условии однократного размораживания непосредственно перед исследованием.

β-Лактамазную активность в околоплодных водах и сыворотке крови, полученной путем центрифугирования цельной свежеприготовленной крови, выдержанной в холодильной камере при +4 °С в течение 4—6 ч для образования фибринового сгустка, при 3000 об/мин в течение 15 мин определяли с использованием тест-системы Биолактан (ГУ ВУ 391353648.001—2011). Учет результатов проводили с помощью программного обеспечения, адаптированного к ИФА-анализатору производства ОАО «Витязь», Республика Беларусь (фотометр универсальный Ф300 ТП).

Возраст обследованных женщин составил от 22 лет до 41 года, средний возраст 33,8 года. У 24 пациенток имелся острый воспалительный процесс (бактериальная инфекция половых путей), 16 женщин были здоровы.

Диагностику заболеваний у пациенток, вошедших в исследование, осуществляли в соответствии с общими принципами и правилами клинической и лабораторной диагностики, изложенными в клинических протоколах наблюдения беременных, рожениц, родильниц, диагностики и лечения в акушерстве и гинекологии, утвержденных Министерством здравоохранения Республики Беларусь (09.10.12 № 1182).

При заборе околоплодных вод проводили посев всех полученных образцов на бактериальную флору.

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета прикладных программ Statistica 10.0, Microsoft Excel 2007. Для обработки статистических данных использовали методы непараметрической статистики. Количественные данные представлены в виде медианы (*Me*) с интерквартильным размахом (25%; 75%). Во всех процедурах статистического анализа критический уровень значимости *p* принимали равным 0,05. Анализ корреляционных зависимостей проведен с использованием метода Спирмена.

Результаты и обсуждение

У всех включенных в исследование пациенток выявлен тот или иной ненулевой уровень β-лактамазной активности сыворотки крови и околоплодных вод.

Средний уровень β-лактамазной активности сыворотки крови составил 57,39 (51,97...62,8). В околоплодных водах установлен более низкий по сравнению с сывороткой крови средний уровень β-лактамазной активности 33,58 (23,37...43,79) (см. таблицу).

Значительно более низкий уровень β-лактамазной активности околоплодных вод по сравнению с сывороткой крови, очевидно, связан с достаточно низким по сравнению с сывороткой содержанием альбумина в околоплодных водах ($2,0 \pm 0,87$ г/л) (Bischof P. и соавт., 1982), который, как было продемонстрировано в ряде исследований (Жильцов и соавт., 2010), вносит основной вклад в собственную β-лактамазную активность и определяет ее базовый уровень.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что средний уровень β-лактамазной активности в околоплодных водах обследованных женщин ниже клинически значимого. Типичные значения активности лежат в интервале 25—45%. Только у 8 (20%) пациенток уровень β-лактамазной активности был выше клинически значимого.

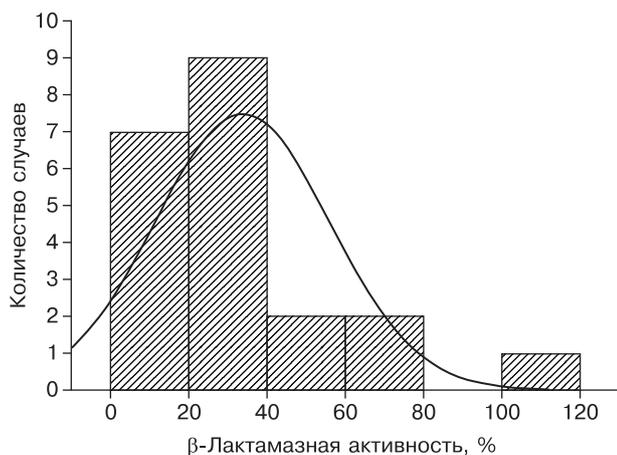
Установлена слабая корреляционная зависимость между уровнем β-лактамазной активности сыворотки крови и околоплодных вод (метод Спирмена, $r = 0,07$) у обследованных пациенток.

Необходимо отметить, что все женщины с высоким уровнем β-лактамазной активности в околоплодных водах имели соотносимо высокий, клинически значимый уровень β-лактамазной активности сыворотки крови.

Ни у одной из обследованных не выявлено контаминации околоплодных вод бактериальной флорой.

Таким образом, можно утверждать, что β-лактамазная активность большинства проб околоплодных вод обусловлена в первую очередь примесями ЧСА. В то же время нельзя исключить, что высокая β-лактамазная активность, регистрируемая в некоторых образцах околоплодных вод, не связана с сывороточным альбумином, и соответственно обусловлена наличием там β-лактамаз, продуцируемых бактериями. Однако, как было описано выше, в ходе исследования не было выявлено ни одного случая контаминации околоплодных вод бактериальной флорой. Следовательно, можно предположить наличие в амниотической жидкости собственной β-лактамазной активности за счет альбумина и/или материнских антигенов, которые структурно соответствуют бактериальным β-лактамазам (антитела второго порядка).

Частотный анализ распределения уровней β-лактамазной активности отдельных проб околоплодных вод



Частотный анализ распределения уровней β-лактамазной активности отдельных проб околоплодных вод.

показал, что большая часть проб околоплодных вод не проявляет значимой β-лактамазной активности (см. рисунок). В то же время четко выделяется относительно небольшая группа образцов околоплодных вод, обладающих высокой (более 40%) β-лактамазной активностью; количество данных случаев составляет 8 (20% от всей выборки, 95% ДИ: 23,37...43,79).

Естественно предположить, что высокий уровень β-лактамазной активности околоплодных вод у данных пациенток может снижать эффективность антибактериальной терапии с применением β-лактаманов антибиотиков, которая проводилась бы в случае наличия у них внутриутробной инфекции бактериальной природы. Более того, образцы околоплодных вод с наиболее высокой (более 40%) β-лактамазной активностью могут содержать значительные количества β-лактамаз, продуцируемых возбудителями внутриутробной инфекции (в частности, *S. aureus* или энтеробактериями), и приводить к неэффективности стартовой терапии β-лактамановыми антибиотиками.

Выводы

1. В околоплодных водах всех обследованных пациенток выявлен определенный уровень β-лактамазной активности; средний уровень указанной активности составляет 33,58% распада внесенного в пробу стандартного количества нитроцефина (95% ДИ: 23,37...43,79), причем значения данного признака меняются в диапазоне от 11,9 до 66,9%.

2. Все женщины с высоким уровнем β-лактамазной активности в околоплодных водах имели высокий, кли-

нически значимый уровень β-лактамазной активности сыворотки крови.

3. Установлено, что клинически значимая β-лактамазная активность околоплодных вод диагностируется у 20% женщин. Высокий уровень β-лактамазной активности у таких пациенток будет препятствовать успешному лечению, снижая эффективность назначенных им антибактериальных препаратов из группы β-лактаманов. В свою очередь определение биологической резистентности к β-лактамановым антибиотикам позволяет сократить необоснованное их применение и повысить эффективность лечения.

4. Поскольку ни у одной из обследованных не выявлено контаминации околоплодных вод бактериальной флорой, можно утверждать, что β-лактамазная активность большинства проб околоплодных вод обусловлена в первую очередь примесью ЧСА.

ЛИТЕРАТУРА (№ 3, 5, 6 — см. REFERENCES)

1. Стриженок Е.А., Гудков И.В., Страчунский Л.С. Применение лекарственных средств при беременности: результаты многоцентрового фармакоэпидемиологического исследования. *Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия*. 2007; 9 (2): 162—75.
2. Семенов В.М., Дмитраченко Т.И., Жильцов И.В. Микробиологические и биологические аспекты резистентности к антимикробным препаратам. *Медицинские новости*. 2004; 2: 7—12.
4. Одинцова Е.С., Пархоменко Т.А., Кундер Е.В., Окулич В.К., Жильцов И.В., Сенькович С.А. и др. ДНК-гидролизующие IgG антитела из крови больных некоторыми инфекционными заболеваниями. *Имунопатология, аллергология, инфектология*. 2006; 2: 23—31.

REFERENCES

1. Strizhenok E.A., Gudkov I.V., Strachunskiy L.S. The use of drugs during pregnancy: results of a multicenter pharmacoepidemiological study. *Klinicheskaya mikrobiologiya i antimikrobnaya khimioterapiya*. 2007; 9 (2): 162—75. (in Russian)
2. Semenov V.M., Dmitrachenko T.I., Zhil'tsov I.V. Microbiological and biological aspects of antimicrobial resistance. *Meditsinskie novosti*. 2004; 2: 7—12. (in Russian)
3. Sideraki V., Huang W., Palzkill T., Gilbert H.F. A secondary drug resistance mutation of TEM-1 beta-lactamase that suppresses misfolding and aggregation. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*. 2001; 98 (1): 283—8.
4. Odintsova E.S., Parkhomenko T.A., Kunder E.V., Okulich V.K., Zhil'tsov I.V., Sen'kovich S.A. et al. DNA-hydrolyzing IgG antibodies from the blood of patients with certain infectious diseases. *Immunopatologiya, allergologiya, infektologiya*. 2006; 2: 23—31. (in Russian)
5. Viswanatha T., Marrone L., Goodfellow V., Dmitrienko G.I. Assays for beta-lactamase activity and inhibition. *Meth. Mol. Med.* 2008; 142: 239—60.
6. Lefevre S., Debat H., Thomas D., Friboulet A., Avale B. A suicide-substrate mechanism for hydrolysis of beta-lactams by an anti-idiotypic catalytic antibody. *FEBS Lett*. 2001; 489 (1): 25—8.

Поступила 12.10.14
Received 12.10.14