

Межрегиональная ассоциация  
по клинической микробиологии  
и антимикробной  
химиотерапии

Научно-исследовательский  
институт антимикробной  
химиотерапии  
Смоленской государственной  
медицинской академии

**Учредитель:**

Межрегиональная ассоциация  
по клинической микробиологии  
и антимикробной химиотерапии

**Издатель:**

ООО «Издательский дом «М-Вести»

Журнал зарегистрирован  
Комитетом РФ по печати  
30.09.1999 г. (№ 019273)  
Тираж 3000 экз.

**Подписные индексы:**

**38290** – для индивидуальных  
подписчиков

**38041** – для предприятий и  
организаций (по объединенному  
каталогу «Подписка-2001», том I)

**КМ 1003** – для индивидуальных  
подписчиков

**КМ 1004** – для предприятий и  
организаций (по Российскому  
медицинскому каталогу)

**Адрес для корреспонденции:**

125284, г. Москва, а/я 74,  
редакция журнала  
«Клиническая микробиология  
и антимикробная химиотерапия»  
Тел./факс: (095)263-5372.

**Адрес электронной почты:**

smac@antibiotic.ru

Электронная версия журнала  
находится в Интернете  
на веб-сайтах  
<http://www.antibiotic.ru>  
<http://www.microbiology.ru/smac>

Присланные в редакцию статьи  
рецензируются

Ответственность за достоверность  
рекламных публикаций несут  
рекламодатели

При перепечатке ссылка на журнал  
обязательна

## **Содержание**

### **Болезни и возбудители**

В.А. Руднов – Вентиляторассоциированная пневмония:  
дискуссионные вопросы терминологии, диагностики  
и эмпирической антибиотикотерапии .....198

В.В. Горбаков, А.И. Хазанов, Н.П. Блохина, И.В. Маев, О.Н. Румянцев,  
Н.Л. Тордия, А.В. Каршиева – Естественное течение сочетанных  
вирусных гепатитов В и С .....209

А.М. Бронштейн, Н.А. Малышев, В.И. Лучшев – Амебиаз: клиника,  
диагностика, лечение .....215

### **Антибиотикорезистентность**

М.В. Эйдельштейн –  $\beta$ -Лактамазы аэробных грамотрицательных  
бактерий: характеристика, основные принципы классификации,  
современные методы выявления и типирования .....223

### **Антимикробные препараты**

Л.С. Страчунский, В.А. Кречиков – Моксифлоксацин – фторхинолон  
нового поколения с широким спектром активности  
(Обзор литературы) .....243

### **Политика применения антибиотиков**

Э.П. Деллинджер – Профилактическое применение антибиотиков  
в хирургии .....260

### **Лабораторная диагностика**

Т.И. Карпова, С.А. Ермолаева, И.В. Лопырев, Н.С. Бродина,  
И.С. Тартаковский, Х.А. Васкес-Боланд – Новый метод идентификации  
*Listeria monocytogenes* .....266

### **Методические рекомендации для клиницистов**

Н. Эмироглу – Заболеваемость дифтерией в Европейском  
регионе ВОЗ. Рекомендации ВОЗ по контролю, лечению  
и профилактике дифтерии .....274

### **Информация**

Хроника МАКМАХ .....280

Краткие правила для авторов .....284

**Главный редактор:**  
Синопальников А.И. Москва

**Исполнительный директор:**  
Пискунов Г.Г. Москва

**Редакторы:**  
Зубков М.Н. Москва  
Козлов Р.С. Смоленск  
Лобзин Ю.В. С.-Петербург  
Руднов В.А. Екатеринбург  
Сидоренко С.В. Москва  
Страчунский Л.С. Смоленск  
Фирсов А.А. Москва

**Ответственный секретарь:** Дехнич А.В.

**Редакционная коллегия:**  
Богомильский М.Р. Москва  
Евструпов А.Н. Новосибирск  
Илькович М.М. С.-Петербург  
Каганов Б.С. Москва  
Катосова Л.К. Москва  
Малеев В.В. Москва  
Падейская Е.Н. Москва  
Рокицкий М.Р. Казань  
Самсыгина Г.А. Москва  
Скрипченко Н.В. С.-Петербург  
Тартаковский И.С. Москва  
Тец В.В. С.-Петербург  
Шляпников С.А. С.-Петербург

**Международный редакционный совет:**  
Акар Ж. Париж, Франция  
Берган Т. Осло, Норвегия  
Бенниш М. Бостон, США  
Березняков И. Харьков, Украина  
Вильямс Д. Лондон, Великобритания  
Гриневиц В. Варшава, Польша  
Гарау Д. Барселона, Испания  
Дзюблик А. Киев, Украина  
Корнаглия Д. Верона, Италия  
Леви С. Бостон, США  
Лернер С. Детройт, США  
Лоде Х. Берлин, Германия  
Миттермайер Х. Линц, Австрия  
Набер К. Мюнхен, Германия  
Норд К. Худинге, Швеция  
Рубинштейн Э. Тель-Авив, Израиль  
Семенов В. Витебск, Белоруссия

**Редактор номера:**  
Ляшенко Н.И. Москва

**Editor-in-Chief:**  
Sinopalnikov A.I. Moscow

**Production Manager:**  
Piskunov G.G. Moscow

**Editors:**  
Zubkov M.N. Moscow  
Kozlov R.S. Smolensk  
Lobzin Yu.V. S.-Petersburg  
Rudnov V.A. Ekaterinburg  
Sidorenko S.V. Moscow  
Stratchounski L.S. Smolensk  
Firsov A.A. Moscow

**Editorial Manager:** Dekhnitch A.V.

**Editorial Board:**  
Bogomilski M.R. Moscow  
Evstropov A.N. Novosibirsk  
Ilkovitch M.M. S.-Petersburg  
Kaganov B.S. Moscow  
Katosova L.K. Moscow  
Maleev V.V. Moscow  
Padejskaja E.N. Moscow  
Rokitecki M.R. Kazan  
Samsigina G.A. Moscow  
Skriptchenko N.V. S.-Petersburg  
Tartakovski I.S. Moscow  
Tetz V.V. S.-Petersburg  
Shliapnikov S.A. S.-Petersburg

**International Editorial Council:**  
Acar J. Paris, France  
Bergan T. Oslo, Norway  
Bennish M. Boston, USA  
Bereznakov I. Charkov, Ukraine  
Williams J. London, UK  
Hryniewicz W. Warsaw, Poland  
Garau J. Barcelona, Spain  
Dzublik A. Kiev, Ukraine  
Cornaglia G. Verona, Italy  
Levy S. Boston, USA  
Lerner S. Detroit, USA  
Lode H. Berlin, Germany  
Mittermayer H. Linz, Austria  
Naber K. Munich, Germany  
Nord K. Hudingge, Sweden  
Rubinstein E. Tel-Aviv, Israel  
Semenov V. Vitebsk, Byelorussia

**Editor of Issue:**  
Ljashenko N.I. Moscow

## Contents

### Diseases and Pathogens

V.A. Rudnov – Ventilator-Associated Pneumonia: Debatable Questions  
in Terminology, Diagnostics and Empirical Antimicrobial Therapy . . . . .198

V.V. Gorbakov, A.I. Hazanov, N.P. Blokhina, I.V. Maev, O.N. Rumiantcev,  
N.L. Tordiya, A.V. Karshieva – The Natural Course of Combined  
Hepatitis B and C . . . . .209

A.M. Bronstein, N.A. Malishev, V.I. Lucshev – Amebiasis:  
Clinical Presentations, Diagnostics, Treatment . . . . .215

### Antimicrobial Resistance

M.V. Edelstein –  $\beta$ -Lactamases of Aerobic Gram-Negative Bacteria:  
Description, Principles of Classification, Methods  
of Detection and Typing . . . . .223

### Antimicrobials

L.S. Stratchounski, V.A. Kretchikov – Moxifloxacin – the New  
fluoroquinolon with Broad Spectrum of Activity  
(The Literature Review) . . . . .243

### Antibiotic Policy

E.P. Dellinger – Prophylactic Antibiotics in Surgery . . . . .260

### Laboratory Diagnostics

T.I. Karpova, S.A. Ermolaeva, I.V. Lopirev, N.S. Brodinova,  
I.S. Tartakovski, J.A. Vazquez-Boland – New Method for Identification  
of *Listeria monocytogenes* . . . . .266

### Guideline for Clinicians

N. Emiroglu – Diphtheria Situation in the European Region of WHO.  
WHO Recommendations on Control, Treatment and Management  
of Diphtheria . . . . .274

### Information

Chronicles of IACMAC . . . . .280

Instructions for Authors . . . . .284

УДК 616.24-002-02

## **Вентиляторассоциированная пневмония: дискуссионные вопросы терминологии, диагностики и эмпирической антибиотикотерапии**

**В.А. Руднов**

*Уральская государственная медицинская академия, Екатеринбург, Россия*

Предлагаемый аналитический обзор посвящен одной из актуальных проблем современной интенсивной терапии – нозокомиальной пневмонии, развивающейся в период проведения искусственной респираторной поддержки (*вентиляторассоциированная пневмония* – ВАП), у пациентов с различными вариантами критических состояний. Обсуждены проблемы терминологии и диагностики, целесообразность комплексного подхода, учитывающего клинико-лабораторно-рентгенологические данные и результаты микробиологических исследований при установлении диагноза. Проанализированы

преимущества и недостатки инвазивных методов микробиологической диагностики. Подчеркнуты факторы риска ВАП, определенные с помощью множественного регрессионного анализа. Критически рассмотрены методические подходы к доказательству наличия атрибутивной летальности. Особое внимание уделено выбору схем эмпирической антимикробной терапии, в том числе и с позиций фармакокинетики/фармакодинамики антибиотиков.

**Ключевые слова:** вентиляторассоциированная пневмония, диагностика, антибактериальная терапия.

## **Ventilator-Associated Pneumonia: Debatable Questions in Terminology, Diagnostics and Empirical Antimicrobial Therapy**

**V.A. Rudnov**

*Ural State Medical Academy, Ekaterinburg, Russia*

The present literature review is devoted to the one of the actual problems in the intensive care units – to the nosocomial pneumonia that is developing during mechanical ventilation (*ventilator-associated pneumonia* – VAP) in patients with different types of critical conditions. The questions of

terminology and diagnosis of VAP are discussed. The appropriateness of complex approach to diagnosis of VAP including clinical, laboratory and roentgenological data, as well as results of microbiological studies is shown. Advantages and disadvantages of invasive methods of microbiological diagnostic are analysed. Risk factors of VAP determined by the multiple regression analysis are listed. Problems of antimicrobial therapy of VAP with particular attention to the choice of antimicrobials for empiric therapy are discussed.

**Key words:** ventilator-associated pneumonia, diagnostic, antimicrobial therapy.

---

Контактный адрес:

Руднов Владимир Александрович  
620142, Екатеринбург, а/я 180  
Тел.: (3432) 60-84-70  
Эл. почта: rudnov@nexcom.ru

Расширение показаний к *искусственной вентиляции легких* (ИВЛ), создание новых поколений аппаратов и совершенствование инвазивной респираторной поддержки заметно улучшили результаты интенсивной терапии при многих критических состояниях. Вместе с тем внедрение в практику новых технологий, повышающих выживаемость в период шока и острой дыхательной недостаточности, изменили общую структуру осложнений и уровень летальности. Более того, появились нозологии, не регистрировавшиеся ранее в клинической практике: *ангиогенный сепсис*, *острый респираторный дистресс-синдром* (ОРДС), *полиорганная недостаточность* (ПОН), *вентиляторассоциированная пневмония* (ВАП) [1–6].

Как одна из распространенных форм *госпитальных инфекций* (ГИ) ВАП может являться самостоятельным осложнением или присоединяться на определенном этапе течения ПОН, повышая риск развития неблагоприятного исхода [2, 5, 6].

Характеристике ВАП в последнее время посвящены серия серьезных самостоятельных исследований и аналитических обзоров, выполненных различными медицинскими специалистами [1–3, 6, 7].

В настоящей публикации представляется важным обсудить ряд аспектов проблемы, получивших неоднозначное трактование.

### Терминология

Наряду с укоренившимся в англоязычной литературе термином *«ventilator-associated pneumonia (VAP)»* в последнее время некоторыми весьма авторитетными отечественными специалистами предложены новые названия данного вида ГИ. Эти действия понятны и объясняются некоторым неблагозвучием прямого перевода на русский язык данного словосочетания.

Так, Б.Р. Гельфанд [2] предлагает пользоваться термином *«нозокомиальная пневмония, связанная с искусственной вентиляцией легких – НПивл»*, объясняя это лингвистической целесообразностью и лучшим отражением связи пневмонии с процессом ИВЛ.

Предложено также для обсуждения определение *«вентиляционная пневмония»*.

Между тем термин *«вентиляционная пневмония»* не указывает на основные причины развития пневмонии при ИВЛ: наличие инородного тела в трахее, подавление кашлевого рефлекса, нарушение глотания, контаминация трахеобронхиального дерева. При его использовании неясно, проводится пациенту ИВЛ или нет, поскольку вентиляция легких может быть спонтанной. Кроме того, данный термин

невольно «скрывает» тяжесть состояния пациента, коррелирующую с риском развития пневмонии.

Причины пневмонии многообразны, а повреждение антиинфекционной защиты легких определено уже самой технологией ИВЛ. В связи с этим представляется, что распространение в практике термина *«вентиляционная пневмония»* вряд ли оправданно.

При буквальном переводе аббревиатуры VAP вентилятор (респиратор) становится как бы главным «виновником» пневмонии. Но следует иметь в виду, что специалисты по интенсивной терапии понимают под словом «respirator» в данном случае процесс ИВЛ. Безусловно, термин НПивл точнее всего передает смысл взаимодействия ИВЛ – пациент – пневмония, но настораживает его некоторая громоздкость.

Следует обратить внимание еще на одно обстоятельство: термин ВАП широко вошел в обиход и в неанглоязычных странах (Франция, Испания, Бельгия, Италия, Аргентина и др.). С начала 90-х годов он используется в нашей стране, многие практические врачи его приняли [7, 6, 8–11].

Анализ и обсуждение ситуации показывают, что вопросы терминологии в большей степени беспокоят отдельных специалистов, а не широкий круг практических врачей. Тем не менее медицинская практика в условиях информационной революции, глобализации и интернационализации науки ставит и будет ставить терминологические проблемы.

По-видимому, наряду с консенсусными решениями в рамках конкретных специальностей необходимо принять национальные рекомендации общего порядка, рассматривающие проблемы терминологии.

В последующих разделах статьи будет использоваться термин ВАП.

### Общие проблемы диагностики ВАП

Некоторые авторы, ориентируясь на общий временной критерий определения ГИ (развитие не ранее 48 ч пребывания в стационаре), распространяют его и на ВАП [6]. Между тем, как показывают клинические наблюдения, возникновение пневмонии возможно и до истечения 2 сут, в частности у больных с абдоминальным сепсисом, высоким индексом тяжести состояния и сопутствующим хроническим обструктивным бронхитом.

Определенный фон пациента и специфика ИВЛ как метода агрессивного лечения микроаспирации, назогастрального или назоинтестинального дренирования создают предпосылки для развития воспалительных изменений в ткани легких в более ранние сроки.

По мнению Б.Р. Гельфанда, этот срок должен быть сокращен до 24 ч [2].

Таблица 1. Дифференциальная диагностика основных клинико-лабораторных и рентгенологических проявлений ВАП

Признак	Очаговые инфильтраты на рентгенограмме	ССВО	Снижение коэффициента оксигенации $PaO_2/FiO_2$	Гнойный характер трахеобронхиального секрета
Дифференциальная диагностика	ОРДС Ателектаз Инфаркт Отек	Основной патологический процесс (травма, панкреонекроз, перитонит и др.) Инфекционные осложнения другой локализации Неинфекционные осложнения (лекарственная лихорадка, тромбоз, переливание компонентов крови)	ОРДС Дефекты проведения ИВЛ	Трахеобронхит

По-видимому, принимая во внимание особенности генеза ВАП, не следует ориентироваться на жесткие временные критерии. Главным определяющим аргументом должна служить динамика клинико-лабораторно-рентгенологических признаков.

При постановке диагноза ВАП реаниматолог испытывает более значительные затруднения, чем при диагностике внебольничной и госпитальной пневмонии у пациентов, находящихся на спонтанном дыхании.

Действительно, гомеостатический фон критических состояний различной природы однотипен и выражается в формировании *синдрома системного воспалительного ответа* (ССВО), а порой и ПОН. Проведение механической ИВЛ само по себе способно провоцировать и усугублять неспецифическое локальное легочное воспаление. Дополнительные сложности создаются в связи с возможностью развития ателектазов, тромбоэмболических осложнений и отека легких.

Перечень основных клинических ситуаций, с которыми необходимо дифференцировать ВАП, представлен в табл. 1.

Значение коэффициента оксигенации имеет вспомогательную диагностическую ценность в совокупности с другими признаками, и только в динамике. По некоторым данным [2], величина  $PaO_2/FiO_2$  была выше 300 у 31,6% пациентов с ВАП.

Анализируя возможности рентгенологического метода исследования, представляется важным отметить, что при компьютерной томографии обнаруживается до 30% инфильтратов у лиц с «интактной» рентгенограммой [2, 12].

Не смогла занять роль «золотого стандарта» и тонкоигольная биопсия легкого из-за трудностей внедрения ее в рутинную практику. Более того, оказалось, что на интерпретацию гистологических данных заметно влияет субъективный фактор. В одном

из недавних исследований частота несовпадений при постановке диагноза пневмонии по одному и тому же гистологическому материалу у 4 высококвалифицированных специалистов варьировала от 18 до 38% [13].

В целях повышения точности диагноза ВАП ряд авторов предлагает унифицированный комплексный подход к диагностике заболевания. Так, эксперты Американского колледжа пульмонологов (*American College of Chest Physicians – ACCP*) [14] рекомендуют учитывать такие признаки, как появление свежих или прогрессирующее очагово-инфильтративных изменений в легких в сочетании по крайней мере с одним из следующих:

- 1) рентгенологические признаки абсцедирования (деструкция на месте предшествовавшей легочной инфильтрации);
- 2) гистологические признаки пневмонии (по данным прижизненной биопсии легкого);
- 3) выделение культуры возбудителя из плевральной жидкости или крови;

или в сочетании с двумя из следующих: *a* – лихорадка ( $>38,3^{\circ}C$ ), *b* – лейкоцитоз ( $>10 \cdot 10^9/l$ ), *v* – гнойная трахеобронхиальная секреция.

Использование критериев ACCP однозначно полезно для включения пациентов в исследование и формирование однородных групп. Однако при практическом их применении обнаруживаются определенные недостатки: позднее развитие абсцедирования, низкая высеваемость патогенов из крови и плевральной жидкости при ВАП, характер мокроты не всегда отражает вовлечение паренхимы легких, вариабельность реакции белой крови на инфекционное воспаление.

В этих условиях не вызывает сомнения необходимость использования при диагностике ВАП наряду с клинико-лабораторно-рентгенологическими данными микробиологического подхода [15, 16, 17].



Таблица 2. **Чувствительность и специфичность количественных методов микробиологической диагностики ВАП\***

Метод	Диагностическое значение, КОЕ/мл	Чувствительность, %	Специфичность, %
Количественная эндотрахеальная аспирация	$10^5$ – $10^6$	67–91	92–59
«Защищенная» браш-биопсия	$\geq 10^3$	64–100	95–60
БАЛ	$\geq 10^4$	72–100	100–69
«Защищенный» БАЛ	$\geq 10^4$	82–92	97–83

\*Адаптировано из J.J. Griffin, G.U. Meduri [18].

Для повышения ценности результатов микробиологических исследований предложено использовать забор материала инвазивными методами («защищенная» браш-биопсия, *бронхоальвеолярный лаваж* – БАЛ, мини-БАЛ), в частности с помощью защищенных приспособлений. Это позволяет свести к минимуму контаминацию проб микрофлорой верхних дыхательных путей или эндотрахеальной трубки, а также количественно оценить полученный материал, дифференцируя инфекционный процесс от колонизации.

Сравнительный суммарный анализ информационной значимости инвазивных методик, выполненный J.J. Griffin и G.U. Meduri [18], представлен в табл. 2.

Анализ приведенных данных указывает на слишком заметный разброс частоты чувствительности и специфичности, характерный для каждой методики. Подобная нестабильность результатов, по-видимому, связана как с квалификацией конкретного специалиста, так и с индивидуальными особенностями течения болезни у отдельных пациентов. Введение катетера или защищенной щетки в интактные отделы легких искажало истинную ситуацию. В пользу этого свидетельствует относительно высокая частота ложноотрицательных результатов (до 41%). Характерно, что некоторые более поздние исследования демонстрировали еще более низкую специфичность – 46%.

В целом имеются основания утверждать, что при адекватной технической обработке методик любая их них может служить подспорьем в постановке диагноза. Однако дать объективную сравнительную характеристику инвазивным и неинвазивным методам количественной оценки обсемененности дыхательных путей затруднительно из-за отсутствия в диагностике ВАП общепризнанного «золотого стандарта». В то же время следует подчеркнуть, что применение БАЛ оказывается полезным и с целью дифференциальной диагностики ВАП и ОРДС [19, 20].

У 44 пациентов, находившихся на ИВЛ и имевших острые инфилтративные изменения на рент-

генограмме легких с синдромом ПОН (индекс тяжести состояния APACHE II =  $19,0 \pm 2,4$ ), развившемся на фоне интраабдоминальной инфекции, нами выполнялся БАЛ. Жидкость центрифугировали, фильтровали и окрашивали по Романовскому–Гимзе, микроскопировали и ставили биохимические тесты. При ВАП в жидкости БАЛ выявлялось достоверно большее число полиморфно-ядерных лейкоцитов, а при ОРДС – содержание общего белка и альбумина [19].

В качестве другого, еще более сложного подхода к диагностике, использующего данные инвазивных методов микробиологической диагностики наряду с клинико-лабораторно-рентгенологическими признаками, а также определение эффективности *антибиотикотерапии* (АБТ) при исключении иной причины лихорадочного состояния, и результаты прижизненного гистологического исследования, необходимо выделить шкалу количественной оценки CPIS – *Clinical Pulmonary Infection Score* [21]. Между тем существенным недостатком шкалы CPIS является сложность ее применения в практических условиях.

При всей объективной полезности для подтверждения ВАП методов инвазивной диагностики следует подчеркнуть их дороговизну и необходимость привлечения дополнительного персонала. Поэтому в большинстве случаев они остаются методами научных исследований, а не повседневной клинической практики.

Возможно, в будущем более широкое применение получат такие недорогие и достаточно информативные методики, как «слепая» защищенная щетка или «слепой» защищенный катетер. Первые результаты их оценки дают для этого основания [22].

В целом преодоление ряда проблем, связанных с диагностикой ВАП, видится на пути улучшения междисциплинарного взаимодействия. Реаниматолог как лечащий врач является центральной фигурой, принимающей решения на основании интеграции всей суммы информации о пациенте, касающейся основного заболевания, тяжести и динамики

Таблица 3. Факторы риска развития ВАП

Связанные факторы риска	
С особенностями пациента	Возраст, сердечно-сосудистая патология, хроническое обструктивное заболевание легких, ОРДС, нарушение сознания, ожоговая травма, ПОН
С технологией ИВЛ	Длительность ИВЛ, давление в манжете менее 20 см вод. ст., реинтубация, смена контура аппарата каждые 24 ч, трахеостомия, неадекватная аспирация мокроты из субглоточного пространства
С общими особенностями ведения больного в ОРИТ	Энтеральное питание, горизонтальное положение больного, назначение H <sub>2</sub> -блокаторов и антибиотиков, использование миорелаксантов

гомеостатических расстройств, факторов риска развития инфекционных осложнений, ответа на терапию.

Важнейшей составляющей такой «информационной системы» при ИВЛ служат данные о распространенности ГИ, их этиологической структуре, уровне и характере антибиотикорезистентности. В этих условиях существенно возрастает роль клинического микробиолога, участвующего в лечебно-диагностическом процессе, а специалист по интенсивной терапии должен стать активным потребителем «микробиологической» информации, используя ее как для диагностики, так и для выбора стратегии антимикробной терапии.

### Эпидемиология и факторы риска ВАП

Отсутствие стандартизированной диагностики и различная исходная тяжесть состояния больных – главные причины широкой вариабельности частоты развития пневмонии при ИВЛ – от 6 до 68% [3, 4–7, 9, 19, 23].

Так, по данным многоцентровых исследований, частота ВАП после плановых операций составляет 6%, у хирургических больных, оперированных по поводу неотложных заболеваний органов брюшной полости, – 34,5% [2], при ОРДС – 55% [1].

По нашим данным, ВАП развивалась в 100% случаев, если исходный индекс тяжести АРАСНЕ II превышал 20 баллов [1]. Вероятно, и тяжесть ОРДС, которая может быть оценена по шкале Мюррея, должна влиять на частоту развития пневмонии.

В связи с тем, что длительность вентиляции повышает риск возникновения пневмонии, оправданно соотносить ее распространенность с числом дней ИВЛ.

В многоцентровом канадском исследовании частота ВАП составляла 14,8 на 1000 дней вентиляции [6]. Такой подход, в частности, позволяет оценивать и свои собственные результаты в хронологическом аспекте.

Факторы риска, выделенные с помощью множественного регрессионного анализа, демонстрируют данные табл. 3 [6].

К сожалению, пока сложно рассматривать истинную распространенность ВАП в России из-за отсутствия стандартов диагностики и интенсивной терапии, низкой оснащенности и крайней гетерогенности пациентов *отделений реанимации и интенсивной терапии* (ОРИТ).

### Этиология ВАП. Влияние предшествующей антибиотикотерапии

В публикациях 90-х годов, исходивших из клиник, оснащенных авторитетными микробиологическими лабораториями, указывается на заметную роль в этиологии *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. и метициллинорезистентных штаммов *Staphylococcus aureus* (MRSA) как в Европе, так и Северной Америке [2, 6, 8, 20–22, 24].

Полимикробная этиология при ВАП регистрируется в 40% случаев [2].

Вместе с тем частота участия отмеченных возбудителей в этиологии ВАП в отдельных центрах значительно варьирует (табл. 4). Так, только у грамотрицательных неферментирующих бактерий (*Pseudomonas aeruginosa*, *Acinetobacter* spp.) она колеблется от 8 до 46,6%.

Из факторов, наиболее существенно детерминирующих этиологическую структуру ВАП, прежде всего выделяют предшествующую антимикробную терапию и длительность ИВЛ [11, 21].

Так, раннее начало ВАП (первые 7 дней механической вентиляции) у больных без предшествующей антибактериальной терапии ассоциируется, как правило, с пневмококком, *Haemophilus influenzae*, семейства *Enterobacteriaceae* без приобретенной резистентности, а также метициллиночувствительным *S. aureus*. Частота выделения анаэробов не превышала 3,5%, а их значение в развитии ВАП окончательно не определено [25].

В когортном исследовании [21], включавшем 129 последовательных эпизодов развития ВАП, грамположительные кокки и гемофильная палочка как этиологически значимые возбудители регистрировались крайне редко при назначении по тем или иным показаниям антибиотиков еще до уста-



Таблица 4. Этиологическая структура ВАП в отдельных ОРИТ, %

Возбудители	J. Rello et al., 1993 [21]	A. Torres et al., 1990 [24]	Б.Р. Гельфанд и соавт., 2000 [2]
Грамположительные:			
<i>Staphylococcus aureus</i>	24,7	8,6	17,8
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	4,4	–	–
Грамотрицательные			
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	21,2	21,7	46,6
<i>Acinetobacter</i> spp.	3,5	39,1	–
семейство <i>Enterobacteriaceae</i>	10,5	8,6	39,8
<i>Haemophilus influenzae</i>	17,6	–	–
Анаэробы	3,5	–	–
Грибы	3,5	4,3	5,5

новления диагноза пневмонии. Доминирующим микроорганизмом у пациентов была *P. aeruginosa*.

J.L. Trouillet и соавт. [11] выявили, что независимыми факторами риска ВАП, вызванной микроорганизмами с множественной резистентностью (*P. aeruginosa*, *Acinetobacter baumannii*, MRSA и *Stenotrophomonas maltophilia*), являются длительность ИВЛ более 7 дней (*отношение шансов* – ОШ = 6), предшествующая антибиотикотерапия (ОШ = 14). Селекции отмеченных возбудителей способствовало назначение цефалоспоринов III поколения, фторхинолонов и имипенема (ОШ = 4). Эта же группа авторов показала влияние предшествующего повреждения легких на этиологию ВАП: при ее развитии на фоне ОРДС в 90% случаев обнаруживались те же микроорганизмы.

Таким образом, при существовании общих закономерностей формирования этиологической структуры ВАП роль отдельных возбудителей в различных медицинских центрах значительно варьирует. Очевидно, что в современных условиях микробный мониторинг ГИ в ОРИТ и создание «банков данных» не менее важны, чем мониторинг гемодинамики и респираторных функций пациентов в критических состояниях.

### Атрибутивная летальность и ВАП

Популяционный добавочный (*атрибутивный*) риск рассчитывается как произведение добавочного риска на распространенность фактора риска в популяции. Применительно к ВАП он отражает *дополнительную летальность* в связи с ее развитием в процессе ИВЛ.

Трудность вынесения объективного заключения о существовании атрибутивной летальности связана с особенностями пациентов ОРИТ, нуждающихся в искусственном замещении функции дыхания. Как правило, у данной категории пациентов имеются и другие весомые факторы риска неблагоприят-

ного исхода: тяжесть основного заболевания, ПОН, декомпенсированная сопутствующая патология, неадекватная терапия и др.

Для выяснения риска дополнительной летальности при возникновении пневмонии используют *три* подхода.

Первый из них связан с применением множественного регрессионного анализа при когортных исследованиях, в результате которых J.Y. Fagon и соавт. [26] на выборке почти 2000 пациентов с нозокомиальной пневмонией показали, что ВАП служит независимым фактором риска смерти. Аналогичные результаты продемонстрированы для поздней ВАП [27] и при микробиологическом подтверждении диагноза с помощью «защищенной» браш-биопсии [28].

Между тем методика продольных когортных исследований не предполагает формирования контрольных групп и не позволяет учесть влияние всех факторов риска, определяющих прогноз.

Второй путь использует сравнительную оценку риска смерти при ВАП и ее отсутствии. При его применении в одном исследовании [29] также удалось доказать существование дополнительной летальности у больных пневмонией, развившейся в ходе ИВЛ. Однако и такой подход нельзя признать достаточно корректным, поскольку он не учитывает диспропорцию групп по самостоятельным факторам риска смерти.

Третий подход заключается в подборе групп, сравнимых по статистически значимым факторам риска смерти и отличающихся друг от друга только наличием пневмонии. При его реализации уже не было получено однозначных выводов.

В 2 работах не обнаружено даже тенденции к повышению летальности [30, 31]. Но в 3 исследованиях все-таки удалось доказать снижение выживаемости или формирование отчетливой тенденции [5, 32, 33].

В канадско-французском исследовании 2-летней давности [33] на 177 больных с ВАП с помощью анализа чувствительности, учитывающего влияние различных субпопуляций, этиологию пневмонии, время развития и адекватность эмпирической АБТ, зарегистрирована лишь тенденция к увеличению абсолютного риска смерти на 5,8% (2,4–14%) и относительного риска на 32,3% (20,6–85,1%). Наряду с этим установлено статистически значимое увеличение длительности (на 4 дня) пребывания в ОРИТ.

Несомненно, что результаты, полученные при использовании данной методики, заслуживают наибольшего внимания, но побуждают к проведению еще более детального анализа клинического материала.

Последовательное рассмотрение популяции пациентов с ВАП позволяет отметить, что она отличается чрезвычайной гетерогенностью, обусловленной критическим состоянием, его тяжестью, характером сопутствующей патологии и степенью ее компенсации, этиологией, возникающими в процессе лечения осложнениями, сроками начала не только адекватной антимикробной терапии, но и полноценности респираторной, гемодинамической, нутритивной и прочей искусственной поддержки.

В этих условиях, вероятно, не стоит однозначно утверждать о присутствии облигатной атрибутивной летальности при всех клинических ситуациях, осложнившихся присоединением ВАП. Предполагается, что она существует для отдельных субпопуляций больных ВАП, не имеющих критических значений индексов тяжести состояния или малообратимых полиорганных расстройств. Во многих случаях излечение от пневмонии просто невозможно без контроля и санации основной патологии.

Необходимо исключать из исследования (или рассматривать отдельно) пациентов с неустраненной или неустраняемой причиной критического состояния (перитонит, панкреонекроз, медиастинит), сохраняющимся нарушением сознания при инсульте и тяжелой черепно-мозговой травме и после нейрохирургических операций.

### **Принципы выбора эмпирической антимикробной терапии**

В последние 4 года опубликованы результаты нескольких проспективных контролируемых исследований, убедительно доказывающих важность назначения адекватной эмпирической антимикробной терапии при ВАП [8–10, 34, 35]. Оказалось, что только в этих обстоятельствах наблюдалось снижение летальности. Коррекция терапии после получения результатов микробиологического исследования уже не оказывала желаемого влияния.

В связи с этим правильный выбор схемы эмпирической АБТ имеет принципиальное значение. В то же время многообразие причин острой дыхательной недостаточности, различия в тяжести исходного статуса пациентов, времени появления пневмонии и особенности АБТ существенно влияют на этиологию ВАП и затрудняют выбор антибиотика.

Для оптимального выбора схемы эмпирической АБТ необходим одновременный учет по крайней мере *пяти* групп факторов (табл. 5):

- 1) время развития пневмонии (первые 5–7 дней или позже);
- 2) наличие предшествующей АБТ(+);
- 3) тяжесть состояния, связанная с основным заболеванием и/или сопутствующей патологией, и возможность прогноза длительности ИВЛ и исхода заболевания;
- 4) этиологическая структура ВАП в конкретном лечебно-профилактическом учреждении и уровень антибиотикорезистентности возбудителей;
- 5) наличие контролируемых исследований, доказывающих эффективность конкретной схемы АБТ.

Рекомендуемые нами схемы эмпирической АБТ отличаются от существующих рекомендаций А.В. Carter и D.B. Hornick [25] и национальных французских рекомендаций [36], поскольку основаны на результатах многоцентровых исследований в России, в которых установлена широкая распространенность штаммов *Klebsiella pneumoniae* – продуцентов  $\beta$ -лактамаз расширенного спектра и высокая устойчивость грамотрицательных неферментирующих бактерий к антисинегнойным ингибиторозащищенным пенициллинам [37]. Поэтому они не должны использоваться для эмпирической терапии поздней ВАП. В этих же исследованиях продемонстрирована высокая активность амикацина в отношении проблемных грамотрицательных микроорганизмов – возбудителей ВАП.

В то же время необходимо иметь в виду, что преимущества комбинированной терапии с добавлением аминогликозидов установлены лишь в случаях синегнойной, клебсиеллезной или ацинетобактерной этиологии пневмонии [36].

Выбор ципрофлоксацина в качестве базисного препарата для эмпирической АБТ или включение в схему терапии ванкомицина должно осуществляться только на основании информации о локальной эпидемиологии и резистентности возбудителей в силу вариабельности распространенности MRSA и устойчивости к ципрофлоксацину грамотрицательных бактерий [37, 38].

Одним из недостатков приведенных рекомендаций является построение схем терапии ВАП вне

Таблица 5. Выбор схемы эмпирической антибиотикотерапии ВАП

Клиническая ситуация	Рекомендуемая схема АБТ
Раннее развитие ВАП, АБТ(-), ПОН(-), тенденция к регрессу основного патологического процесса, потенциальная возможность прекращения ИВЛ в течение 7 дней	Ингибиторозащищенные пенициллины или цефалоспорины III поколения (цефтриаксон или цефотаксим)
Раннее развитие ВАП, АБТ(-), ПОН(+), труднопрогнозируемая длительность ИВЛ	Цефепим ± амикацин Карбапенемы
Позднее развитие ВАП, АБТ(+), ПОН(-), регресс основного заболевания	Цефепим + амикацин Ципрофлоксацин + амикацин Цефтазидим + амикацин
Позднее развитие ВАП, АБТ(+), ПОН(+), труднопрогнозируемая длительность ИВЛ	Карбапенемы ± амикацин ± ванкомицин

связи с причиной критического состояния. Между тем во многих случаях возникновение инфекционного процесса в легочной паренхиме в ходе искусственной респираторной поддержки происходит на фоне патологии, требующей назначения АБТ.

По нашему мнению, для рационального выбора препарата определенное значение имеют и прогноз течения основного патологического процесса, и связанная с ним оценка возможной длительности ИВЛ. Такой прогноз может быть сделан на основании характера нозологии, особенностей преморбидного фона пациента, наличия ПОН и ее тяжести.

Так, в случае ранней ВАП у пациента с перитонитом и ПОН по 2–3 системам, шоком и риском развития летального исхода с вероятностью более 40%, а также труднопрогнозируемой длительностью ИВЛ имеет смысл назначить препараты с максимальной активностью против потенциальных возбудителей инфекций в различных анатомических областях (карбапенемов или цефепима), не ожидая истечения 7-х суток, когда их включение будет запоздалым или раннее формирование ВАП у пациента с тяжелой черепно-мозговой травмой, требующей длительной ИВЛ (более 10 дней).

Назначение цефалоспоринов III поколения не гарантирует достижения клинического эффекта при сохраняющихся тяжелых расстройствах сознания и продолжении ИВЛ, но способствует селекции неферментирующих бактерий и, возможно, присоединению суперинфекции, что потребует смены схемы терапии. В итоге при любом клиническом исходе стоимость лечения будет выше.

### Специфика ОРИТ и выбор схемы лечения

Известно, что доля пациентов, в лечении которых используется искусственная респираторная поддержка, в различных ОРИТ может заметно отличаться.

В связи с отсутствием общероссийской статистики приводим данные: по Европе – 4–35%, локаль-

ные по Екатеринбург за 2000 г. – 0,5–15% (неопубликованные). Вполне очевидно, что чем больше больных, нуждающихся в пролонгированной ИВЛ, тем выше частота инфекционных осложнений в нижних дыхательных путях. Постоянная концентрация подобных пациентов в общей палате создает условия для перекрестной передачи бактериальных штаммов, в том числе обладающих множественной резистентностью к антибиотикам.

В этих экологических условиях помимо выполнения определенных противоэпидемических мероприятий следует проводить политику ротации антибиотиков для стартовой эмпирической терапии. Ее целесообразность доказана рядом исследователей.

Так, М.Н. Kollef и соавт. [39], чередуя назначения цефтазидима и ципрофлоксацина каждые 6 мес, отметили статистически значимое снижение частоты ВАП, вызванной полирезистентными грамотрицательными бактериями. Наиболее весомые аргументы получены при использовании цефепима [40]. Расширение показаний к применению цефепима оправданно прежде всего с позиций высокой активности против потенциальных возбудителей, уступающей только карбапенемам, и в связи с результатами контролируемых исследований [40–43].

### Выбор стратегии антибиотикотерапии при ВАП: дезэскалационная или эскалационная терапия?

Более высокая летальность, наблюдаемая у пациентов с выполненной коррекцией схемы АБТ, в связи с получением результатов микробиологического исследования или отсутствием клинического эффекта побуждает отдавать предпочтение *деэскалационной терапии*. Старт терапии с антибиотиков, обладающих максимально высокой активностью против всех наиболее вероятных возбудителей этого вида госпитальной пневмонии (карбапенемы или цефепим) в моноварианте или в комбинации с аминогликозидами, сопровождается не только луч-

шими клиническими результатами, но и меньшими затратами на лечение в целом [8–10, 34, 43].

В последние годы в контролируемых исследованиях доказана статистически значимая высокая клиническая эффективность комбинации цефепим/амикацин, а также монотерапии меропенемом перед прежде весьма популярной схемой цефтазидим/амикацин [43, 44].

### Фармакодинамика антибиотиков и выбор режима дозирования

В связи с высокой частотой неудач терапии ГИ, вызванных полирезистентными штаммами микроорганизмов, обоснованы попытки выбора препаратов и режима дозирования с учетом их фармакодинамических свойств. Фармакодинамика антимикробных препаратов описывает взаимосвязь между концентрацией антибиотиков в биологических средах организма и бактерицидной активностью.

J.J. Schentag и соавт. [45], анализируя результаты АБТ у пациентов с госпитальной пневмонией, установили, что скорость эрадикации возбудителя коррелировала со временем поддержания концентрации антибиотика в крови выше *минимальной подавляющей концентрации* (МПК) для данного возбудителя и величиной отношения площади под кривой концентрации (выше МПК) в течение 24 ч к МПК.

Данный расчетный параметр принято описывать аббревиатурой АУИС – *area under inhibitory curve*. Приемлемый клинический ответ наблюдался, когда значение АУИС, получаемое с помощью одного антибиотика или их комбинации, превышало величину 125. Если значение АУИС было на уровне 125, элиминация бактерий как при использовании фторхинолонов, так и  $\beta$ -лактамов осуществлялась за 7 дней. Увеличение АУИС до 250 сокращало время микробной эрадикации до 1–2 сут на фоне применения фторхинолонов, но не  $\beta$ -лактамов антибиотиков.

Более того, при использовании антибиотиков в дозах, не позволявших достичь величины АУИС, равной 125, наблюдалась селекция субпопуляций резистентных штаммов микроорганизмов.

Безусловно, выбор схемы терапии с позиций фармакокинетики и фармакодинамики является оптимальным. Он позволяет определить индивидуальный режим дозирования, предсказать клинический ответ на конкретный препарат и снизить риск селекции резистентных штаммов бактерий в конкретном отделении. К сожалению, практическая реализация данного подхода доступна крайне ограниченному числу лечебно-профилактических учреждений.

Тем не менее можно сделать следующие выводы, имеющие важное практическое значение для рациональной терапии ВАП.

1. Соотнесение фармакокинетических параметров препаратов, приведенных в табл. 5, и суммарных данных об их активности против наиболее значимых возбудителей ВАП позволило сделать следующее заключение относительно их режима дозирования при нормальном клиренсе креатинина: аминогликозиды должны назначаться 1 раз в сутки, ципрофлоксацин – 3 раза, цефалоспорины с периодом полувыведения 1–2 ч – 3–6 раз, ингибиторозащищенные пенициллины (пиперациллин/тазобактам и тикарциллин/клавуланат) – 6 раз, цефепим – 2–3 раза.

2. В связи с широкой распространенностью *P. aeruginosa* и *Acinetobacter* spp. как возбудителей ВАП и более высокими значениями МПК (1–8 мг/л) для всех потенциально активных антимикробных средств обоснованно назначение препаратов в максимальных дозах с увеличением кратности их введения: ципрофлоксацин – по 400 мг 3 раза в сутки, имипенем – 3–4 г/сут, меропенем – 3 г/сут, цефепим – 4–6 г/сут, цефтазидим – 6 г/сут.

3. Принимая во внимание суммарные данные о МПК в отношении возбудителей ВАП [46–49] и фармакокинетический профиль  $\beta$ -лактамов, наиболее высокие значения АУИС получаются при использовании карбапенемов.

4. При МПК аминогликозидов (амикацин, тобрамицин) 1–2 мг/л в отношении большинства возбудителей госпитальной пневмонии значения АУИС будут находиться на уровне 30–50 [45]. Поэтому аминогликозиды могут и должны быть использованы только в качестве компонента комбинированной терапии инфекций, вызванных некоторыми «проблемными» микроорганизмами.

5. По-видимому, если  $\beta$ -лактамовый антибиотик обеспечивает значение АУИС выше 125, проводить комбинированную терапию не следует.

6. В качестве возможных вариантов терапии ВАП, вызванных *P. aeruginosa*, следует использовать комбинацию  $\beta$ -лактамов (карбапенемы, цефтазидим, цефепим) с амикацином или ципрофлоксацином.

7. Включение ванкомицина в схему эмпирической терапии оправданно лишь при высокой распространенности MRSA в конкретном ОРИТ.

### Заключение

Повышение выживаемости и увеличение продолжительности жизни больных с различными формами тяжелой гипоксии во многом связаны с широким внедрением в практику искусственной респираторной поддержки. Наиболее частым осложнением данного инвазивного метода интенсив-

ной терапии является пневмония, увеличивающая в некоторых случаях летальность, длительность нахождения в ОРИТ и материальные затраты. Главную роль в ее генезе играют исходная тяжесть состояния пациента, общие особенности ведения больных в ОРИТ и технология ИВЛ.

Диагностика пневмонии в процессе проведения ИВЛ может быть затруднительной в связи с отсутствием «золотого стандарта». Необходим поиск доступных для широкой практики высокоинформативных методов инвазивной микробиологической диагностики.

## Литература

1. Боровик А.В. Роль и место бронхоальвеолярного лаважа в уточнении характера острого легочного повреждения при критических состояниях. Тезисы докладов VI Всероссийского съезда анестезиологов и реаниматологов. М; 1998. с. 66.
2. Гельфанд Б.Р., Гологорский В.А., Белоцерковский Б.З. и др. Нозокомиальная пневмония, связанная с искусственной вентиляцией легких (ИПивл) у хирургических больных. М; 2000.
3. Кассиль В.Л. Искусственная вентиляция легких в интенсивной терапии. М.: Медицина; 1987.
4. Fagon J.-Y., Chastre J., Hance A.J., et al. Nosocomial pneumonia in patients receiving continuous mechanical ventilation. *Am Rev Respir Dis* 1989; 139:871-4.
5. Fagon J.-Y., Chastre J., Hance A.J., et al. Nosocomial pneumonia in ventilated patients: a cohort study evaluating attributable mortality and hospital stay. *Am J Med* 1993; 94:281-8.
6. Cook D. Ventilator-associated pneumonia: perspectives on the burden illness. *Intensive Care Med* 2000; 26(Suppl.1): 31-7.
7. Синопальников А.И., Дмитриев Ю.К. Вентиляторассоциированная пневмония: критерии диагностики, прогноз, эмпирическая антибактериальная терапия. *Рос мед вести* 2000; 3:45-51.
8. Alvarez-Lerma F. Modification of empiric antibiotic treatment in patients with pneumonia acquired in intensive care unit: ICU-Acquired Pneumonia Study Group. *Intensive Care Med* 1996; 22:387-94.
9. Rello J., Gallego M., Mariscal D., Sonora R., et al. The value of routine microbial investigation in ventilator-associated pneumonia. *Am J Resp Crit Care Med* 1997; 156:196-200.
10. Luna C.M., Vujacich P., Niederman M.S., et al. Impact of BAL data on the therapy and outcome of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1997; 111:676-85.
11. Trouillet J.L., Chastre J., Vuagnant A., et al. Ventilator-associated pneumonia caused by potentially drug resistant bacteria. *Am Rev Resp Crit Care Med* 1998; 157:531-9.
12. Beydon I., Saada M., Liu N., et al. Can portable chest X-ray examination accurately diagnose lung consolidation after major surgery? A comparison with computed tomography scan. *Chest* 1992; 102:1698-703.
13. Corley D.E., Kitrland S.H., Winterbauer R.H., et al. Reproducibility of the histologic diagnosis of pneumonia among a panel of four pathologist: analysis of a gold standard. *Chest* 1997; 112:458-65.
14. Pingleton S.K., Fagon J.Y., Leeper K.V. Patient selection for clinical investigation of ventilator-associated pneumonia: criteria for evaluating diagnostic techniques. *Chest* 1992; 102:553-6.
15. Baker A.M., Bowton D.L., Haponik E.F. Decision making in nosocomial pneumonia: an analytic approach to the interpretation of quantitative bronchoscopic cultures. *Chest* 1995; 107:85-95.
16. Fagon J.-Y., Chastre J., Wolff M., et al. Invasive and non-invasive strategies for management of suspected ventilator-associated pneumonia. A randomized trial. *Ann Intern Med* 2000; 132:621-30.
17. Heyland D.K., Cook D.J., Marshall J., et al. The clinical utility of invasive diagnostic techniques in the setting of ventilator-associated pneumonia. *Canadian Critical Care Trials Group. Chest* 1999; 115:1076-84.
18. Griffin J.J., Meduri G.U. New approaches in the diagnosis of nosocomial pneumonia. *Med Clin North Am* 1994; 78:1091-112.
19. Боровик А.В., Руднов В.А. Нозокомиальная пневмония при проведении продленной ИВЛ. *Вестн интенсивной тер* 1996; 2-3:29-33.
20. Croce M.A., Fabian T.C., Schurr M.J. Using bronchoalveolar lavage to distinguish nosocomial pneumonia from systemic inflammatory response syndrome: a prospective analysis. *J Trauma* 1995; 39 (6):1134-9.
21. Rello J., Ausina V., Ricart M., et al. Impact of previous antimicrobial therapy on the etiology and outcome of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1993; 104:1230-5.
22. Gallego M., Valles J., Rello J. New perspectives in the diagnosis of nosocomial pneumonia. *Curr Opin Pulm Med* 1997; 3:116-9.
23. Bowton D.L. Nosocomial pneumoniae in the ICU – year 2000 and beyond. *Chest* 1999; 115:1-7.
24. Torres A., Aznar R., Gatell J.M., et al. Incidence, risk, and prognosis factors of nosocomial pneumoniae in mechanically ventilated patients. *Am Rev Respir Dis* 1990; 142:523-8.



25. Carter A.B., Hornick D.B. Therapy for ventilator-associated pneumonia. *Clin Chest Med* 1999; 20 (3):681-91.
26. Fagon J.-Y., Chastre J., Vuanangt A., et al. Nosocomial pneumonia and mortality among patients in ICU. *JAMA* 1996; 275:866-9.
27. Kollef M., Silver P., Murphy D.M. The effect of late-onset VAP in determining patient mortality. *Chest* 1995; 108:1655-62.
28. Bregeon F., Papazian L., Visconti A., et al. Relationship of microbiologic diagnostic criteria to morbidity and mortality in patients with VAP. *JAMA* 1997;277:655-62.
29. Cunnion K.M., Weber D.J., Broadhead W.E., et al. Risk factors for nosocomial pneumonia: comparing adult critical care population. *Am J Resp Crit Care Med* 1996; 153:358-62.
30. Baker A.M., Meredith J.W., Haponik E.F. Pneumonia in intubated trauma patients. *Am J Resp Crit Care Med* 1996; 153:343-9.
31. Papazian L., Bregeon F., Thirion X., et al. Effect of ventilator-associated pneumonia on mortality and morbidity. *Am J Resp Crit Care Med* 1996; 154:91-7.
32. Craig C.P., Connelly S. Effect of ICU nosocomial pneumonia on duration of stay and mortality. *Am J Infection Control* 1984; 12:233-8.
33. Heyland D.K., Cook D.J., Griffith L.E., et al. Attributive morbidity and mortality of ventilator-associated pneumonia in the critical ill patients. *Am J Resp crit Care Med* 1999; 159 (4):1249-56.
34. Kollef M.H., Ward S. The influence of mini-BAL cultures on patient outcomes: implications for the antibiotic management of ventilator-associated pneumonia. *Chest* 1998; 113:412-20.
35. Kollef M.H. Ventilator-associated pneumonia: the importance of initial empiric antibiotic selection. *Infect Med* 2000; 17:278-83.
36. Chastre J., Trouillet J.-L. Nosocomial pneumonia: guidelines for initial management and empirical treatment. *Eur Res Mon* 1997; 3:101-17.
37. Состояние антибиотикорезистентности грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций в отделениях интенсивной терапии. Межведомственный научный совет по внутрибольничным инфекциям при РАМН и Минздраве РФ, Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии 1997.
38. Vincent J.-L. Microbial resistance: lessons from EPIC study. *Intensive Care Med* 2000; 26 (1):3-8.
39. Kollef M.H., Vlasnik J., Sharpless L., et al. Scheduled change of antibiotic classes: a strategy to decrease the incidence of ventilator-associated pneumonia. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 156:1040-8.
40. Goossens H. The role of cefepime in preserving and restoring *in vitro* bacterial susceptibility patterns. *Infectious Dis Clin Pract* 1999; Special suppl:5-7.
41. Сидоренко С.В., Страчунский Л.С., Ахметова Л.И. и др. Результаты многоцентрового исследования сравнительной активности цефепима и других антибиотиков в отношении возбудителей тяжелых госпитальных инфекций (программа Micromax). *Антибиотики и химиотер* 1999; 44 (11):7-22.
42. Cost-effectiveness analysis of cefepime compared with ceftazidime in intensive care unit patients with hospital-acquired pneumonia. *Infectious Dis Clin Pract* 1999; 8 (5):245-51.
43. Beaucaire G. Cefepime in the empirical treatment of hospital-acquired pneumonia: recent microbiological, clinical and pharmacoeconomic data. *Infectious Dis Clin Pract* 1999; Special suppl: 8-10.
44. Lerma A. The Serous Infection Study Group Efficacy of meropenem as monotherapy in the treatment of ventilator-associated pneumonia. *J Chemother* 2001; 13 (1):70-81.
45. Schentag J. Antimicrobial action and pharmacokinetics / pharmacodynamics: the use of AUC to improve efficacy and avoid resistance. *J Chemother* 1999; 11:426-39.
46. Госпитальные инфекции, вызванные *Pseudomonas aeruginosa*. Распространенность и клиническое значение антибиотикорезистентности. *Антибиотики и химиотер* 1999; 44 (3):25-34.
47. Iaconis J.P., Pitkin D.H., Sheikh W., et al. Comparison *in vitro* activity of meropenem and six other antimicrobials against *P. aeruginosa* isolates from North American studies and clinical trials. *Clin Infect Dis* 1997; 24 (S2): 191-7.
48. Paterson D.L., Ko W., von Gottenberg A. *In vitro* susceptibility and clinical outcome of bacteremia due extended-spectrum beta-lactamase producing *Klebsiella pneumoniae*. *Clin Infect Dis* 1998; 27:956.
49. Cisneros J.M., Reyes M.J. Pachon J., et al. Bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*: epidemiology, clinical findings and prognostic features. *Clin Infect Dis* 1996; 22:1026-32.



УДК [616.36-002.14:578.891]-036.1

## Естественное течение сочетанных вирусных гепатитов В и С

В.В. Горбаков, А.И. Хазанов, Н.П. Блохина, И.В. Маев, О.Н. Румянцев,  
Н.Л. Тордия, А.В. Каршиева

Государственный институт усовершенствования врачей Министерства обороны РФ, Москва, Россия  
Московский государственный медико-стоматологический университет, Россия

Обследованы 136 пациентов, у которых одновременно выявлены HBsAg и anti-HCV. Всем проводили полное клинико-лабораторное и инструментальное обследование, включая определение HBV-ДНК и HCV-РНК методом полимеразной цепной реакции.

У пациентов с одновременным выявлением HBsAg и anti-HCV частота обнаружения HBV-ДНК составила лишь 7%, тогда как HCV-РНК – 84%. То есть у подавляющей части пациентов в момент обследования имелась только репликация HCV. У пациентов с *хроническим гепатитом В* (ХГ В) после инфицирования HCV HBV-ДНК и HCV-РНК одновременно выявлялись у 42% па-

циентов, у 33% – только HCV-РНК, у 25% – только HBV-ДНК. Это свидетельствует о том, что инфицирование HCV пациентов с ХГ В спустя 1,5–2 года приводит к стойкому исчезновению из сыворотки крови того или иного вирусного генома более чем у половины пациентов, причем наиболее часто обнаруживается элиминация HBV-ДНК. Однако окончательные выводы о течении сочетанной HBV- и HCV-инфекции могут быть сделаны только на основании результатов исследований на большем количестве пациентов.

**Ключевые слова:** вирусный гепатит, вирус гепатита В, вирус гепатита С, сочетанный вирусный гепатит.

## The Natural Course of Combined Hepatitis B and C

V.V. Gorbakov, A.I. Hazanov, N.P. Blokhina, I.V. Maev, O.N. Rumiantsev,  
N.L. Tordiya, A.V. Karshieva

State Medical Institute of Postgraduate Course, Ministry of Defense, Moscow, Russia  
Moscow State Medical and Dental University, Moscow, Russia

One hundred thirty six patients in whom HBsAg and anti-HCV have been simultaneously detected were investigated. In all cases the complete clinical, laboratory and instrumental procedures including detection of HBV-DNA and HCV-RNA by PCR were performed.

In patients with simultaneously detected HBsAg and anti-HCV the rate of detection of HBV-DNA was only 7% when HCV-RNA has been detected in 84% of cases. Thus, in vast majority of patients included in the study only replication of HCV was found. After

infection by HCV in patients with *chronic hepatitis B* (CH B) HBV-DNA and HCV-RNA were detected simultaneously in 42% of cases, in 33% of patients only HCV-RNA and in 25% of patients only HBV-DNA were found. It indicates that infection of CH B patients by HCV after 1,5–2 years results in stable disappearance of the genome of one of the viruses from serum in half of patients, moreover the elimination of HBV-DNA was found to be more common. However, to make the final conclusion about the course of combined viral hepatitis B and C we need the results of studies on larger quantity of patients.

**Key words:** viral hepatitis, hepatitis B virus, hepatitis C virus, combined viral hepatitis.

Контактный адрес:  
Владимир Валентинович Горбаков  
Тел./факс: (095) 563-83-07

Увеличение числа вирусных агентов, вызывающих гепатит, появление в последние годы новых возможностей их диагностики и учащение случаев поливирусных заболеваний заставляют более пристально взглянуть на проблему смешанной инфекции [1, 2, 3].

Среди различных сочетаний возбудителей, вызывающих *вирусный гепатит* (ВГ), на первое место выходит смешанная HBV/HCV-инфекция [2, 4, 5]. Подобное сочетание диагностируется как при острой, так и при хронической инфекции [2, 6, 7, 8]. Особенно часто такие заболевания стали наблюдаться в последние 5–6 лет, когда начался рост заболеваемости наркоманиями.

Примерно у 10–20% пациентов, инфицированных *вирусом гепатита В* (HBV), выявляется HCV-инфекция. У пациентов с наличием anti-HCV в 2–10% случаев обнаруживаются маркеры HBV [2, 9]. При анализе этиологической структуры заболеваемости ВГ в России и за рубежом на долю HBV/HCV-инфекции, по данным разных авторов, приходится от 3 до 26,3%, а у лиц, употребляющих наркотики, – до 45% [2, 8]. Нередко определение «ведущей» инфекции представляет значительные трудности.

При смешанной хронической HBV/HCV-инфекции относительно редко можно обнаружить сразу два исследуемых вирусных генома, что, по мнению многих авторов, связано с феноменом вирусной интерференции [2, 4, 5, 9]. При этом возникают как ситуации взаимного ингибирования двух геномов [10–15], проявляющиеся впоследствии изолированным доминированием одного из них, так и единичные случаи полного самоизлечения, когда оба маркера вирусной репликации (HBV-ДНК и HCV-РНК) перестают определяться [2]. С другой стороны, имеются данные, свидетельствующие о кумулирующем эффекте при инфицировании двумя вирусами, приводящем к более быстрому прогрессированию патологического процесса в печени, чем при моноинфекции [8, 9, 16, 17].

Неоднозначны и противоречивы представления о доминирующей активности вирусов при сочетанной HBV/HCV-инфекции. Данные одних авторов свидетельствуют о том, что ведущая роль в патогенезе активного гепатита у большинства пациентов с комбинированной HBV/HCV-инфекцией принадлежит HCV [5, 6, 18, 19, 20, 21]. В работах других авторов, напротив, доминирующая роль отводится HBV [17, 22]. Частота выявления HCV-РНК у пациентов с HBV/HCV-инфекцией зависит также от состояния системы HBe/анти-HBe. HCV-РНК гораздо чаще встречается у HBeAg-негативных пациентов, чем у HBeAg-позитивных [2, 15].

Таким образом, возникают серьезные трудности в установлении ведущей вирусной инфекции, а ли-

тературные данные, касающиеся естественного течения сочетанных вирусных гепатитов В и С, являются весьма противоречивыми и требуют дальнейшего детального изучения.

## Материал и методы исследования

Обследованы 136 пациентов, у которых одновременно выявлены HBsAg и anti-HCV. Анализировали пол, возраст и длительность болезни. Особо изучался анамнез заболевания с целью установления точного времени инфицирования вирусами.

У большинства пациентов, несмотря на тщательное анамнестическое обследование, невозможно было определить последовательность инфицирования HBV и HCV. Во всех случаях проводили полное клинико-лабораторное и инструментальное обследование, включая определение HBV-ДНК и HCV-РНК методом *полимеразной цепной реакции* (ПЦР), в том числе у части пациентов – количественное.

Из общей группы особо выделены 12 пациентов (средний срок болезни –  $5,7 \pm 1,3$  года) с морфологически и вирусологически доказанным *хроническим гепатитом В* (ХГ В), у которых на определенном этапе заболевания произошло инфицирование HCV. В последующие 1,5–2 года за больными осуществлялся клинико-биохимический и вирусологический мониторинг. Результаты наблюдения за этими пациентами представлены на рис. 1.



Рис. 1. Дизайн исследования

В качестве группы сравнения обследованы 67 бессимптомных HBsAg-носителей (отсутствие клиники заболевания, нормальная активность аминотрансфераз), отобранных методом случайной выборки, с целью выявления у них репликативной активности HBV-инфекции.

## Результаты исследования

Данные о частоте выявления HBV-ДНК и HCV-РНК у пациентов с сочетанной инфекцией (HBsAg и anti-HCV) представлены в табл. 1.

Таблица 1. Частота выявления HBV-ДНК и HCV-РНК у пациентов с сочетанной инфекцией, % ( $p \pm m_p$ )

Лабораторный показатель	HBsAg + anti-HCV, $n=136$
HBV-ДНК	7±2
HCV-РНК	84±3

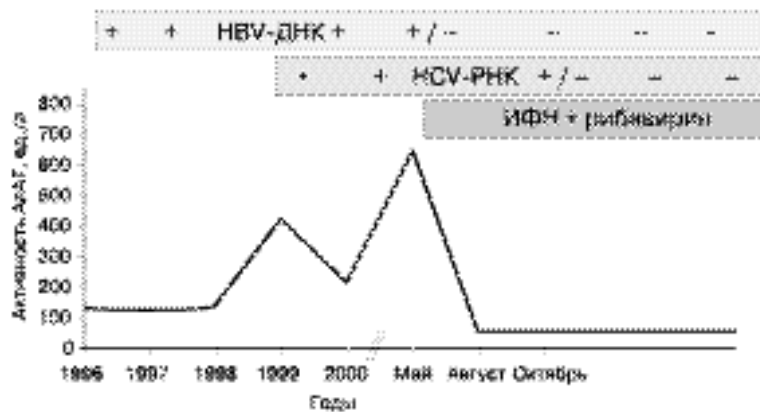


Рис. 2. Подавление репликации HCV-РНК на фоне противовирусной терапии у больного М.

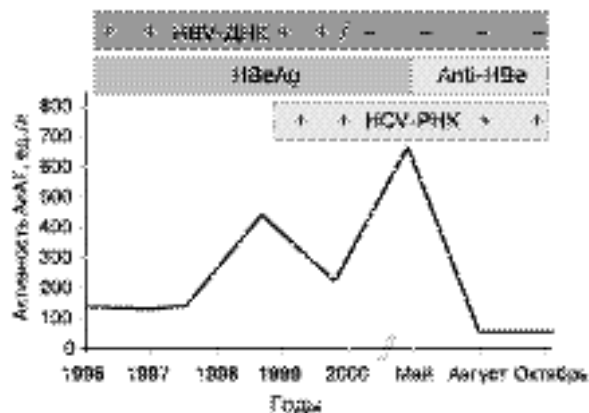


Рис. 3. Индуцированная HCV-инфекцией сероконверсия HBeAg у больного М.

Как следует из данных табл. 1, у пациентов с одновременным выявлением HBsAg и anti-HCV частота обнаружения HBV-ДНК составляла лишь 7±2%, тогда как HCV-РНК – 84±3%. То есть у подавляющей части пациентов этой группы в момент обследования имелась только репликация HCV.

Неожиданными оказались результаты вирусологического обследования HBsAg-носителей. У 64% лиц данной группы в сыворотке крови обнаруживалась HBV-ДНК.

Данные о соотношении частоты выявления HBV-ДНК и HCV-РНК у 12 пациентов с ХГ В спустя 1,5–2 года после инфицирования HCV представлены на рис. 1.

Как следует из данных рис. 1, после инфицирования HCV оба маркера репликации выявлялись в 42% случаев. У 33% пациентов определялась только HCV-РНК, у 25% – только HBV-ДНК.

Результаты данного наблюдения свидетельствуют, что инфицирование HCV при ХГ В спустя 1,5–2 года приводит (по всей вероятности, в результате вирусной интерференции) к стойкому исчезновению из сыворотки крови того или иного вирусного генома более чем у половины пациентов. Причем чаще всего обнаруживается элиминация HBV-ДНК.

В табл. 2 представлена динамика клинико-лабораторных показателей у пациентов с ХГ В на фоне присоединения ХГ С. Из данных табл. 2 следует, что треть пациентов с ХГ В до инфицирования HCV была HBeAg-положительной. В результате инфицирования HCV и развития ХГ С количество HBeAg-положительных пациентов уменьшилось до 16,7±11,2%, что заставляет предположить возможность индуцирующего влияния HCV на сероконверсию по HBeAg.

Отмечалось снижение активности АЛТ, а также некоторое (возможно,

Таблица 2. Динамика клинико-лабораторных показателей у больных хроническим гепатитом В на фоне присоединения хронического гепатита С, ( $n=12$ )

Клинико-лабораторные показатели	До инфицирования HCV	После инфицирования HCV
Продолжительность заболевания, лет	5,60±0,63	1,70±0,47
HBV-ДНК, %	100,0	66,7±14,2
HBeAg, %	33,3±14,2	16,7±11,2
Активность АлАТ, ед./л	129,0±3,2	78,0±1,3

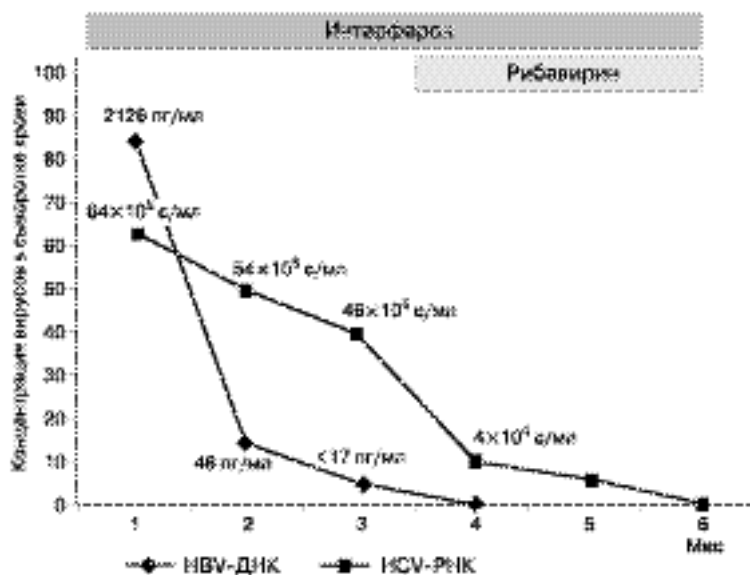


Рис. 4. Динамика концентрации HBV-ДНК и HCV-РНК на фоне противовирусной терапии

субъективное) улучшение общего состояния. То есть складывается впечатление, что инфицирование HCV пациентов с ХГ В приводит к снижению активности патологического процесса.

Данные рис. 2 и 3 демонстрируют клинические примеры, подтверждающие содержание рис. 1 и табл. 1 и 2.

В последние годы появилась возможность количественного определения HBV-ДНК и HCV-РНК методом ПЦР. На рис. 4 приведено клиническое наблюдение, демонстрирующее количественную динамику HBV-ДНК и HCV-РНК у пациента с хроническим микст-гепатитом на фоне специфической терапии. Как следует из данных рис. 4, терапия интерфероном  $\alpha$  привела к элиминации HBV из сыворотки крови, а дополнительное назначение 1000 мг/сут рибавирина спустя 6 мес от начала лечения способствовало подавлению репликации HCV.

#### Обсуждение результатов исследования

Явное учащение случаев сочетанных вирусных инфекций (HBV+HCV) требует более тщательной расшифровки взаимоотношения этих вирусов. К сожалению, в большинстве публикаций, посвящен-

ных вопросам сочетанных инфекций, не рассматривается характер патологического процесса в печени (острый или хронический), не изучается последовательность инфицирования вирусами, а факт микст-инфекции устанавливается на основании выявления маркеров гепатитов методом иммуноферментного анализа. Безусловно, сочетанную HBV/HCV-инфекцию необходимо рассматривать по крайней мере в *четырёх* патогенетических вариантах:

- 1) острый вирусный гепатит С (ОВГ С), развившийся на фоне ХГ В;
- 2) манифестация ОВГ В на фоне ХГ С;
- 3) вариант ХГ С+ХГ В;
- 4) редкую, но теоретически возможную ситуацию, когда имеется ОВГ С + ОВГ В.

Данные табл. 1 свидетельствуют, что у большинства пациентов с «сочетанной» инфекцией (HBsAg + anti-HCV), где последовательность заражения не была определена, выявляется репликация только HCV. Логично предположить, что на начальном этапе болезни, обусловленной сочетанной инфекцией, имеет место репликация обоих вирусов. Однако в последующем подавляется репликация одного из вирусов, чаще HBV. Длительное наблюдение за 12 больными ХГ В, у которых на определенном этапе болезни происходит инфицирование HCV и развивается ХГ С (рис. 1), подтверждает данное предположение.

Интересны данные J. Crespo и соавт. (1997), исследовавших концентрацию HBV-ДНК и HCV-РНК у пациентов с моно- и сочетанной инфекцией (табл. 4).

Как следует из представленных данных, концентрация HBV-ДНК и HCV-РНК при микст-гепатитах в несколько раз ниже, чем при моноинфекции. Данное наблюдение также позволяет сделать вывод о взаимном редуцирующем влиянии двух вирусов.

Анализируя данные табл. 2, нельзя не обратить внимания на тот факт, что у половины больных HBeAg-положительным ХГ В спустя 1,5–2 года после инфицирования HCV происходит сероконверсия. Конечно, в ряде случаев она может быть спонтанной, однако клиническое наблюдение (рис. 2) сви-

Таблица 4. Концентрация HBV-ДНК и HCV-РНК при моноинфекции и микст-гепатите HBV/HCV

Геном	Моноинфекция	Микст-гепатит HBV/HCV
HBV-ДНК, пг/мл	66,4	11,5
HCV-РНК, с/мл	37,0	5,5

детельствует, что по крайней мере у части пациентов сероконверсия может быть индуцирована HCV.

Практически отсутствуют литературные данные о подходах к терапии данной группы пациентов. Следуя формальной логике, больным с хронической HBV/HCV-инфекцией следует назначать тройную терапию (интерферон + рибавирин + ламивудин), рассчитывая на одновременное подавление репликации обоих вирусов. Однако, анализируя представленные данные, возникает вопрос: стоит ли спешить с лечением ВГ С, если HCV-инфекция сама по себе способствует подавлению в большинстве случаев репликации HBV? Наконец, может быть, данной группе больных целесообразно назначать на 1–3 мес интерферон (как это было в приведенном клиническом наблюдении), а затем в зависимости от темпов снижения концентрации HBV-ДНК и HCV-РНК подключать либо рибавирин, либо ламивудин.

Вопрос об оптимальной терапии хронических микст-гепатитов не решен, в литературе он практически не обсуждается и требует тщательного изучения.

## Литература

1. Арямкина О.Л., Климова Н.Н., Коваленко Е.Н., Савоненкова Л.Н., Савоськин А.Н. Клиническая характеристика больных диффузными хроническими заболеваниями печени вирусной HBV- и HCV-этиологии. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол 2001; 1 (Прил12):5.
2. Шкурко Т.В. Клинико-диагностические особенности смешанной HBV/ HCV-инфекции у взрослых. Автореф дис; 1998.
3. Горбаков В.В., Блохина Н.П., Хазанов А.И., Румянцев О.Н., Маев И.В., Тордия Н.Л., Каршиева А.В. Частота обнаружения HBV-ДНК в сыворотке крови «HBsAg-носителей» и больных с одновременным выявлением анти-HCV и HBsAg. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол 2001; 1 (Прил 12):9.
4. Жданов К.В., Лобзин Ю.В., Мукомолов С.Л., Кошиль О.И., Чирский В.С., Бацков С.С., Бельгесов Н.В. Клинико-лабораторные и морфологические исследования при субклинических формах инфекции вирусами гепатита В и С у лиц молодого возраста. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол 1996; 4 (Прил 3):174.
5. Заика Г.Е., Гилева Р.А., Захарова Е.В., Машерская Г.П., Миничев В.П., Поволоцкая Л.М. Клинико-биохимические различия гепатитов С и С+В в острой и хронической стадии. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол 2001; 1 (Прил 12):11.
6. Корочкина О.В., Соболевская О.Л. Вирусспецифическая Т-лимфоцитарная реакция в прогнозировании

## Выводы

1. В большинстве случаев так называемых хронических микст-гепатитов (HBsAg + anti-HCV) наблюдается только репликация HCV.
2. Большинство (64%) бессимптомных HBsAg-носителей являются потенциальными больными хроническим гепатитом В и нуждаются в длительном динамическом наблюдении.
3. Доказанное инфицирование HCV больных ХГ В более чем в половине случаев приводит к подавлению репликации одного из вирусов, чаще HBV.
4. HCV-инфекция может индуцировать сероконверсию HBeAg.
5. Решение вопроса об адекватной терапии хронических микст-гепатитов облегчает исследование концентрации вирусов в сыворотке крови в динамике.
6. Окончательные выводы о течении сочетанной HBV- и HCV-инфекции могут быть сделаны только на основании результатов исследований на большой выборке пациентов.

- угрозы хронизации микстгепатита В+С. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол 1996; 4 (Прил 3): 178.
7. Минушкин О.Н., Румянцев О.Н. Особенности течения хронических гепатитов, ассоциированных с сочетанной инфекцией вирусами В и С. Рос журн гастроэнтерол гепатол колопроктол 2001; 1 (Прил 12):41.
  8. Майер К.-П. Гепатит и последствия гепатита. М: ГЭ-ОТАР Медицина; 1999.
  9. Хазанов А.И., Логинов А.Ф., Цырик В.А., Скворцов С.В., Самоходская Л.М., Михайлов М.И. Острый вирусный гепатит В на фоне хронического гепатита С, протекавший с клинически выраженной сероконверсией в момент появления анти-HBe и анти-HBs. Рос мед вести 1998; 2:65-9.
  10. Koike K., Yasuda K., Yotsuyanagi H., et al. Dominant replication of either virus in dual infection with hepatitis viruses B and C. J Med Virol 1995; 45:236-9.
  11. Crespo J., Lozano J.L., Carte B., et al. Viral replication in patients with concomitant hepatitis B and C virus infection. Eur J Clin Microbiol Infect Dis 1997; 16:445-51.
  12. Okhawa K., Hayashi N., Yuki N., et al. Long term follow-up of hepatitis B virus and hepatitis C virus replicative levels in chronic hepatitis patients coinfecting with both viruses. J Med Virol 1995; 46:258-64.
  13. Tsai J.F., Jeng J.E., Ho M.S., et al. Independent and additive effect modification of hepatitis C and B viruses infection on the development of chronic hepatitis. J Hepatology 1996; 24:271-6.
  14. Huang E.J., Wright T.L., Lake J.R., et al. Hepatitis B and C coinfections and persistent hepatitis B infection:



- Clinical outcome and liver pathology after transplantation. *Hepatology* 1996; 23:396-404.
15. Serfaty L., Chazouilleres O., Poujol-Robert A., et al. Risk factors for cirrhosis in patients with chronic hepatitis C virus infection: Results of a case-control study. *Hepatology* 1997; 26 (3):776.
  16. Institute of Liver Studies, Kings College Hospital, London, UK. Hepatitis Central, HBV+ HCV=HCC? *Gut* 1999; 45:168-9.
  17. Zarski J.P., Bohn B., Pawlowsky J.M., et al. *J Hepatology* 1998; 28:27-33.
  18. Liaw Y.F., Tsai S.L., Chang J.J., et al. Displacement of hepatitis B virus by hepatitis C virus as the cause of continuing hepatitis. *Gastroenterology* 1994; 106:1048-53.
  19. Mimms L.T., Mosley J.W., Hollinger B.F., et al. Effect of concurrent acute infection with hepatitis C virus on acute hepatitis B virus infections. *Br Med J* 1993; 307:1095-7.
  20. Sato S., Fujiyama S., Tanaka M., et al. Coinfection of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis B infection. *J Hepatology* 1994; 21:159-66.
  21. Tsai S.L., Liaw Y.F., Yeh C.T., et al. Cellular immune responses in patients with dual infection of hepatitis B and C viruses: Dominant role of hepatitis C virus. *Hepatology* 1995; 21:908-12.
  22. Sheen I.S., Liaw Y.F., Chu C.M., et al. Role of hepatitis C virus infection in spontaneous hepatitis B surface antigen clearance during chronic hepatitis B infection. *J Infect Dis* 1992; 165:831-4.



УДК 616.993.12-07-08

## Амебиаз: клиника, диагностика, лечение

А.М. Бронштейн<sup>1</sup>, Н.А. Малышев<sup>2</sup>, В.И. Лучшев<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Институт медицинской паразитологии и тропической медицины им. Е.И. Марциновского, Московская медицинская академия им. И.М. Сеченова, Москва, Россия

<sup>2</sup>Клиническая инфекционная больница № 1, Москва, Россия

<sup>3</sup>Кафедра инфекционных болезней, тропической медицины и эпидемиологии Российского государственного медицинского университета, Москва, Россия

Амебиаз – паразитарная болезнь человека, вызываемая патогенными штаммами *Entamoeba histolytica*, является одной из важнейших проблем здравоохранения развивающихся стран и одной из наиболее частых причин летальных исходов при паразитарных болезнях кишечника.

В методических рекомендациях приведены

основные сведения об амебиазе, его клинических проявлениях, лечении и профилактике. Обсуждаются вопросы лечения инвазивного и неинвазивного амебиаза.

Для терапевтов, инфекционистов, педиатров, эпидемиологов.

**Ключевые слова:** диарея, простейшие, амебиаз, амебоциды.

## Amebiasis: Clinical Presentations, Diagnostics, Treatment

A.M. Bronstein<sup>1</sup>, N.A. Malishev<sup>2</sup>, V.I. Lucshev<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Institute of Medical Parasitology and Tropical Medicine Named Under E.I. Martzinovski, Moscow Medical Academy Named Under I.M. Setchenov, Moscow, Russia

<sup>2</sup>Clinical Infectious Diseases Hospital No. 1, Moscow, Russia

<sup>3</sup>Department of Infectious Diseases, Tropical Medicine and Epidemiology of Russian State Medical University, Moscow, Russia

Amebiasis is a parasitic human disease caused by pathogenic strains of *Entamoeba histolytica*, and is one of the most important problems of public health in developing countries and one the main causes of death from parasitic intestinal diseases.

The overview of amebiasis, its clinical presentations, treatment and prophylaxis are given.

Амебиаз – болезнь, вызываемая патогенными штаммами *Entamoeba histolytica*, имеющими широкое распространение в мире, преимущественно в странах тропического и субтропического климата. Характерный для этих районов низкий уровень са-

Approaches to the therapy of invasive and noninvasive amebiasis are presented.

For infectious diseases clinicians, pediatricians, epidemiologist.

**Key words:** diarrhea, protozoal infections, amebiasis, amebicides.

нитарии обуславливает высокую заболеваемость амебиазом.

В настоящее время амебиаз представляет одну из крупнейших медицинских и социальных проблем населения развивающихся стран и является одной из наиболее частых причин смерти при паразитарных болезнях кишечника. После малярии данная инфекция занимает второе место в мире по частоте летальных исходов при паразитарных заболеваниях [1, 2].

Около 480 млн людей в мире являются носителями *E. histolytica*, из них у 48 млн (10%) развивают-

Контактный адрес:

Александр Маркович Бронштейн  
103287, Москва, ул. Писцовая, 10,  
ГКБ № 24 (clin. отдел ИМП и ТМ)  
Тел. / факс (095) 285-26-69  
Эл. почта: bronstein@mail.ru

ся колит и внекишечные абсцессы, у 40 000 – 100 000 заболевших наступает летальный исход [3]. Миграция, ухудшение экономического положения ряда развивающихся стран, низкий уровень санитарии способствуют распространению амебиаза и соответственно росту заболеваемости.

В России амебиаз встречается в южных регионах. Вместе с тем в связи с возрастающим притоком мигрантов из южных регионов стран ближнего и дальнего зарубежья, увеличением въездного туризма, а также существенным увеличением зарубежного туризма, в том числе в страны с жарким климатом, случаи амебиаза у граждан России, в том числе жителей Москвы, значительно участились.

### **Паразит-возбудитель: таксономия, морфология и жизненный цикл**

Из фекалий человека можно выделить 7 видов амёб: *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba dispar*, *Entamoeba hartmannii*, *Entamoeba coli*, *Endolimax nana*, *Iodameba buetschlii* и *Blastocystis hominis*. Однако только *E. histolytica* может вызывать инвазивные инфекции у человека.

Отмечаемый ранее диссонанс между высокой частотой выделения *E. histolytica* и в то же время относительно низкой частотой клинических проявлений отчасти, как оказалось, связан с наличием в популяции *E. histolytica* двух видов амёб – потенциально патогенных штаммов *E. histolytica* и непатогенной *E. dispar*, различить которые можно лишь путем анализа ДНК [4]. В последние годы разработан чувствительный и специфичный метод *полимеразной цепной реакции* (ПЦР), позволяющий относительно просто и быстро идентифицировать в фекалиях одновременно *E. histolytica* и *E. dispar* [5].

Вместе с тем вопрос о различии патогенности штаммов внутри вида *E. histolytica* остается недостаточно ясным. Посредством изоэнзимного анализа выявлено 9 потенциально патогенных зимодемов *E. histolytica* и 13, по-видимому, непатогенных зимодемов, между которыми выявлены также отличия в ДНК [6, 7].

*E. histolytica* относится к роду *Entamoeba*, принадлежащему к семейству *Entamoebidae*, отряду *Amoebida*, классу *Lobosea*, суперклассу *Rhizopoda*, подтипу *Sarcodina*, типу *Protozoa*.

Цисты *E. histolytica* с водой или с пищевыми продуктами попадают в желудочно-кишечный тракт. В тонкой кишке под действием кишечных ферментов оболочка цисты растворяется и образуется 8 одноядерных амёб. В результате последующих делений они превращаются в вегетативные просветные стадии (трофозоиты размером от 10 до 60 мкм, в среднем – 25 мкм), имеющие одно ядро, местом обита-

ния которых является просвет верхних отделов толстой кишки. По мере продвижения по кишечнику трофозоиты превращаются в одно- / четырехъядерные цисты (в среднем 12 мкм в диаметре), которые выделяются с фекалиями.

При попадании в организм человека цист *E. histolytica* вследствие воздействия ряда факторов образуются инвазивные формы паразита. В развитии инвазивных форм имеют значение такие факторы паразита и хозяина, как интенсивность инвазии, физико-химическая среда кишечника (характер секрета слизистой оболочки, нарушение перистальтики кишечника), иммунодефицит, голодание, стресс и др. В частности, нередко развиваются инвазивные формы амебиаза у беременных [1, 8, 9]. Имеются также данные, что у лиц, инфицированных ВИЧ, инвазивный амебиаз развивается чаще [10, 11].

Инвазивные, или так называемые тканевые стадии амёб – бóльших размеров, чем просветные, могут фагоцитировать эритроциты, обладают протеолитическими свойствами и поверхностными лектинами, способствующими их прикреплению к слизистой оболочке кишечника [6, 12].

В последнее время установлено, что основным фактором вирулентности у *E. histolytica* являются цистеиновые протеиназы, отсутствующие у *E. dispar*. Дальнейшие исследования в этом направлении могут способствовать разработке ингибиторов цистеин-протеиназ, которые можно будет использовать при создании новых амёбоцидов [13].

В соответствии с патоморфологическими изменениями и клинической картиной выделяют *инвазивный* амебиаз, при котором развиваются патологические изменения, и *неинвазивный* [6].

Для инвазивного амебиаза характерны:

- клинические симптомы инфекционного заболевания;
- наличие трофозоитов-гематофагов в фекалиях;
- характерные изменения в слизистой оболочке кишечника при эндоскопическом исследовании;
- наличие специфических антител, выявляемых серологическими тестами.

Для неинвазивного кишечного амебиаза (это состояние также определяют как носительство амёбных цист) характерны:

- бессимптомное течение;
- отсутствие трофозоитов-гематофагов;
- отсутствие патологических изменений при эндоскопическом исследовании;
- отсутствие специфических антител.

Только у незначительной части лиц, инфицированных амёбами, разовьется инвазивный амебиаз. В странах, где *E. histolytica* широко распространена,

у 90% инфицированных лиц имеется неинвазивный амебиаз. Они являются бессимптомными носителями просветных форм амеб, и только у 10% инфицированных развивается инвазивный амебиаз [1, 2, 3].

Патологические изменения и клинические проявления инвазивного амебиаза варьируют в широких пределах – от колита со слабовыраженными клиническими проявлениями до фульминантного колита и амебного абсцесса печени. Наиболее частые клинические проявления инвазивного амебиаза – амебный колит и амебный абсцесс печени. Причем амебный колит встречается в 5–50 раз чаще, чем амебный абсцесс печени [1]. Основной причиной летальных исходов при амебиазе являются абсцесс печени и фульминантный колит [14, 15, 16].

### **Клинические формы инвазивного амебиаза**

#### ***Кишечный амебиаз***

Бессимптомное нахождение (носительство) просветных форм *E. histolytica* в толстой кишке может отмечаться многие годы. Однако в любой момент просветные формы могут перейти в тканевые формы, вызывающие инвазивный, или клинически выраженный амебиаз.

Первичные проявления амебиаза заключаются в образовании небольших участков некроза в слизистой оболочке толстой кишки, которые могут прогрессировать с образованием язв. Язва может увеличиваться не только по периферии за счет подслизистого слоя, но и в глубину, достигая мышечной и даже серозной оболочки. Глубокий некротический процесс ведет к образованию перитонеальных спаек и является причиной прободных перитонитов. Амебные язвы могут распространяться по всей толстой кишке, но чаще локализуются в слепой кишке.

Типичные амебные язвы резко отграничены от окружающих тканей, имеют неровные края. На дне язвы – некротические массы, состоящие из фибрина и содержащие трофозоиты амеб. Воспалительная реакция выражена слабо. Некротический процесс в центре, подрывтые и приподнятые края язвы, реактивная гиперемия и геморрагические изменения вокруг нее составляют наиболее типичные черты изъязвлений при кишечном амебиазе.

Наряду с изменениями слизистой оболочки и некрозом в кишечной стенке идет регенеративный процесс, ведущий к восстановлению дефекта путем образования фиброзной ткани. Такой процесс при хроническом амебиазе может вести к образованию стриктур и стеноза просвета кишки, обычно в восходящем и нисходящем отделах толстой кишки. При присоединении вторичной бактериальной инфекции образуется экссудат, содержащий нейтро-

филы, лимфоциты, гистиоциты, иногда эозинофилы.

При локализации поражений в ректосигмоидном участке толстой кишки клиническая картина может соответствовать дизентерийному синдрому с тенезмами. Относительно нечасто в испражнениях бывает примесь слизи, крови и гноя. При локализации поражений в слепой кишке обычно отмечаются запоры с болями в правой подвздошной области, характерные для клинической картины аппендицита (в ряде случаев действительно развивается аппендицит). Локализация амебных поражений в подвздошной кишке встречается значительно реже [1, 17, 18].

#### ***Клинические варианты течения кишечного амебиаза***

*Острый кишечный амебиаз (острый амебный колит)* обычно проявляется в виде одной диареи. Реже развивается синдром *амебной дизентерии*: острое начало, схваткообразные боли в животе, тенезмы, жидкие фекалии с кровью и слизью. Высокая лихорадка и другие системные проявления, как правило, не наблюдаются. У детей младшего возраста обычно отмечаются лихорадка, рвота, дегидратация [1, 6, 18].

*Молниеносный (фульминантный) амебный колит*. Тяжелотекущая некротизирующая форма кишечного амебиаза характеризуется токсическим синдромом, тотальными глубокими повреждениями слизистой оболочки кишечника, кровотечениями, перфорацией, перитонитом. Чаще отмечается у беременных женщин и женщин в послеродовый период. Может развиваться после назначения кортикостероидов. Летальность достигает 70% [15, 16, 17].

*Затяжной кишечный амебиаз (первично-хронический амебиаз, постдизентерийный колит)*. Характерны нарушения моторики кишечника, разжиженные фекалии, запоры (в 50% случаев) или поносы, чередующиеся с запорами, боли в нижней половине живота, тошнота, слабость, плохой аппетит. В ряде случаев хронический кишечный амебиаз является следствием перенесенной амебной дизентерии [1].

Осложнения кишечного амебиаза:

- *перфорация кишки*, слепой, реже в ректосигмоидном участке, может вести к развитию перитонита и абсцесса в брюшной полости;
- *амебный аппендицит*;
- *массивное кишечное кровотечение* при эрозии крупной артерии язвой;
- *амебома* – опухолевидное разрастание в стенке толстой кишки, преимущественно в восходящей ободочной, слепой и прямой; состоит из фибробластов, коллагена и клеточных элементов, содержит относительно небольшое число амеб;

– *амебная стриктура кишечника* – образуется грануляционной тканью; стриктуры обычно единичные, образуются в слепой или сигмовидной ободочной кишке, содержат трофозоиты амёб, часто бессимптомны, иногда способствуют развитию запоров и частичной кишечной непроходимости.

### **Внекишечный амёбиаз**

Патологические изменения при внекишечном амёбиазе могут развиваться практически во всех органах, однако чаще поражается печень.

*Абсцесс печени.* При амёбном абсцессе печени указания на перенесенный ранее кишечный амёбиаз выявляются только у 30–40% пациентов, амёбы в фекалиях обнаруживаются не более чем у 20% больных.

Амёбный абсцесс печени чаще развивается у взрослых, чем у детей, у мужчин чаще, чем у женщин [19]. Единичные или множественные абсцессы образуются чаще в правой доле печени. Абсцесс состоит из *трех* зон:

– *центральной* – зона некроза, содержащая жидкие некротические массы с примесью крови, обычно стерильная (бактериальная инфекция присоединяется в 2–3% случаев);

– *средней*, состоящей из стромы;

– *наружной*, содержащей трофозоиты амёб и фибрин.

Для амёбного абсцесса характерны лихорадка с ознобом и обильное потоотделение ночью, увеличение печени и боль в области ее проекции, умеренный лейкоцитоз. При крупных абсцессах возможно развитие желтухи, что является плохим прогностическим признаком. При вовлечении в патологический процесс диафрагмы выявляется высокое стояние ее купола, ограничение подвижности. Возможно развитие ателектазов.

Относительно часто (10–20%) отмечается длительное скрытое или нетипичное течение абсцесса (например, только лихорадка, псевдохолецистит, желтуха) с возможным последующим прорывом его, что может вести к развитию перитонита и поражению органов грудной полости [14, 20].

*Плеврорегочный амёбиаз* является следствием прорыва абсцесса печени через диафрагму в легкие, реже – за счет гематогенного распространения амёб. Проявляется развитием эмпиемы плевры, абсцессов в легких и печеночно-бронхиальной фистулы. Характерны боль в груди, кашель, одышка, гной и кровь в мокроте, озноб, лихорадка, лейкоцитоз [1, 14].

*Амёбный перикардит* обычно развивается за счет прорыва абсцесса печени из левой доли через диафрагму в перикард, что может вести к тампонаде сердца и летальному исходу [1].

*Церебральный амёбиаз* – форма гематогенного происхождения. Абсцессы могут быть единичными и множественными, находиться в любом участке мозга, но чаще в левом полушарии. Начало обычно острое, течение молниеносное с летальным исходом [1].

*Кожный амёбиаз* встречается чаще у ослабленных и истощенных больных. Язвы обычно локализуются в перианальной области, на месте прорыва абсцессов в области фистулы. У гомосексуалистов возможны в области половых органов [1].

### **Лабораторная и инструментальная диагностика амёбиоза**

Наиболее простой и надежный метод диагностики кишечного амёбиоза – микроскопическое исследование фекалий для выявления вегетативных форм (трофозоитов) и цист [21]. Трофозоиты обычно выявляются у больных в период диареи, а цисты – в оформленном кале. С этой целью готовят нативные препараты непосредственно из фекалий и/или из обогащенных проб.

При первичной микроскопии исследуют нативные препараты из свежих проб фекалий с физиологическим раствором. В дальнейшем для идентификации трофозоитов амёб нативные препараты из свежих проб фекалий окрашивают раствором Люголя или буферным метиленовым синим. Для идентификации цист нативные препараты, приготовленные из свежих и/или обработанных консервантом проб фекалий, окрашивают йодом. Выявление амёб более эффективно при немедленном исследовании фекалий после их забора.

В пробе фекалий с малым количеством паразитов при исследовании нативных препаратов они выявляются не всегда. Поэтому дополнительно следует использовать методы обогащения. В качестве метода обогащения обычно используется эфирформалиновое осаждение. Однако методом обогащения обычно можно выявить только цисты, так как трофозоиты деформируются.

Выявление только цист амёб не подтверждает наличие болезни – инвазивного амёбиоза. Поэтому исследование нативных и окрашенных препаратов является обязательным начальным этапом микроскопического исследования, а использование методов обогащения показано в случаях, когда исследование нативных препаратов дает отрицательные результаты.

При сомнении в видовой принадлежности трофозоитов и цист и необходимости длительного хранения препаратов, например с целью доставки их в референтную лабораторию для экспертной оценки, можно приготовить перманентно окрашенные пре-

параты. Для этого обычно используют трихромовый метод окраски.

Наиболее простой и надежный метод диагностики кишечного амебиоза – микроскопирование свежих фекалий. Для этого необходимы высококачественный микроскоп и подготовленный персонал. Однако даже опытный лаборант может не дифференцировать непатогенные простейшие, лейкоциты, макрофаги, содержащие эритроциты или частично переваренную растительную клетчатку, от трофозоитов амев, а также идентифицировать цисты простейших. При невозможности обеспечения качественной диагностики на месте возможна консервация фекалий с последующей их транспортировкой в специализированную лабораторию [21].

При клинических данных, указывающих на возможное поражение кишечника, рекомендуется ректо- или колоноскопия. При ректо- и колоноскопии целесообразна биопсия из пораженных участков кишки для выявления амев и дифференциальной диагностики, в частности с карциномой. Этими методами можно выявить язвы в кишке, амебомы, стриктуры и другие патологические изменения. Характерные изменения при амебиозе – очаговый, а не диффузный тип поражения [6, 12].

Диагностика внекишечного амебиоза, в частности абсцесса печени, проводится путем ультразвукографии и компьютерной томографии, которые позволяют определить локализацию, размеры и число абсцессов, а также контролировать результаты лечения. Рентгенологическое исследование позволяет выявить высокое стояние купола диафрагмы, выпот в плевральной полости, абсцессы в легких.

При необходимости проводят аспирацию содержимого абсцесса. Амебы редко находятся в центре некротических масс. Обычно они локализируются в наружных стенках абсцесса.

Для диагностики амев можно использовать серологические тесты, выявляющие специфические

антитела. Тесты особенно полезны для диагностики внекишечного амевиаза, поскольку в таких случаях инвазивные стадии *E. histolytica* в фекалиях, как правило, отсутствуют.

Поскольку назначение кортикостероидов при амевиазе может способствовать резкому ухудшению течения болезни, серологическая диагностика также рекомендуется всем больным, у которых можно подозревать амевиаз и у которых планируется лечение кортикостероидами.

### Лечение амевиаза

Все препараты, используемые для лечения амевиаза, можно разделить на 2 группы: *контактные*, или *просветные* (воздействующие на кишечные просветные формы) и *системные тканевые амевоциды* [22].

Для лечения *неинвазивного* амевиаза (бессимптомных носителей) используют просветные амевоциды. Их также рекомендуется назначать после завершения лечения тканевыми амевоцидами для элиминации амев, оставшихся в кишечнике, с целью профилактики рецидивов. Имеются наблюдения о развитии амевных абсцессов печени при кишечном амевиазе, когда больные получали только тканевые амевоциды без последующего назначения просветных амевоцидов [1, 14]. В частности, описан рецидив амевного абсцесса печени у больного через 17 лет после успешно излеченного, впервые выявленного абсцесса печени [23].

При невозможности предотвратить повторное заражение применять просветные амевоциды нецелесообразно. В этих ситуациях рекомендуется назначать просветные амевоциды только по эпидемиологическим показаниям, например, тем, чья профессиональная деятельность может способствовать заражению других лиц, в частности работникам предприятий питания.

К **просветным амевоцидам** относятся: *этофа-*

Таблица 1. Химиопрепараты, используемые для лечения амевиаза

Амебиоз	5-Нитроимидазолы <sup>1</sup>	Просветные амевоциды	Дегидроэметин <sup>2</sup>	Хлорохин <sup>3</sup>
Неинвазивный (носительство)	-/+	+	-	-
Кишечный	+	+	+	-
Внекишечный	+	+	+	+

<sup>1</sup> Препараты группы 5-нитроимидазолов хорошо всасываются и, как правило, их назначают *per os*. Парентеральное (внутривенное) введение этих препаратов применяют у больных с тяжелым клиническим течением амевиаза, у которых невозможен их пероральный прием.

<sup>2</sup> Вследствие возможного развития тяжелых нежелательных реакций, прежде всего кардиотоксического эффекта, дегидроэметин является препаратом резерва, и его рекомендуется назначать внутримышечно больным с обширными абсцессами, больным, у которых предыдущие курсы 5-нитроимидазолов оказались неэффективными, а также больным с тяжелым клиническим течением, у которых невозможен прием препаратов *per os*.

<sup>3</sup> Хлорохин назначают в сочетании с дегидроэметином при лечении амевных абсцессов печени.



Таблица 2. Схемы лечения амебиоза

**Кишечный амебиоз**

Метронидазол – внутрь 30 мг/кг в день в 3 приема в течение 8–10 дней  
или

Тинидазол – внутрь 30 мг/кг один раз в сутки в течение 3 дней,  
или

Орнидазол – внутрь 30 мг/кг один раз в сутки в течение 3 дней,  
или

Секнидазол – внутрь 30 мг/кг один раз в сутки в течение 3 дней

**Амебный абсцесс**

Метронидазол – 30 мг/кг в день в 3 приема в течение 8–10 дней  
или

Тинидазол – 30 мг/кг один раз в сутки в течение 5–10 дней,  
или

Орнидазол – 30 мг/кг один раз в сутки в течение 5–10 дней,  
или

Секнидазол – 30 мг/кг один раз в сутки в течение 5–10 дней

**Альтернативная схема лечения амебного абсцесса**

Дегидроэметин дигидрохлорид – 1 мг/кг в сутки внутримышечно (не более 60 мг) в течение 4–6 дней  
+

Одновременно или сразу же после завершения курса лечения дегидроэметином при амебных абсцессах печени рекомендуется хлорохин – 600 мг основания в сутки в течение 2 дней, затем по 300 мг основания в течение 2–3 нед

**После завершения курса лечения 5-нитроимидазолами или дегидроэметином с целью элиминации оставшихся в кишечнике амеб применяют просветные амебоциды:**

этофамид – 20 мг/кг в сутки в 2 приема в течение 5–7 дней

паромомицин – 1000 мг/сут в 2 приема в течение 5–10 дней

мид (китнос), клефамид, дилоксанид фураат и паромомицин. Последние 3 препарата в России не зарегистрированы.

Для лечения *инвазивного* амелиоза применяют системные тканевые амебоциды. Препаратами выбора из этой группы являются 5-нитроимидазолы, которые используют как для лечения кишечного амелиоза, так и абсцессов любой локализации.

**В группу системных тканевых амебоцидов входят 5-нитроимидазолы:** метронидазол (*трихопол*, *флагил*), тинидазол (*тиниба*, *фасижин*), орнидазол (*тиберал*) и секнидазол

Помимо препаратов из группы 5-нитроимидазолов для лечения *инвазивного* амелиоза, прежде всего амебных абсцессов печени, рекомендуется использовать *дегидроэметин дигидрохлорид* (в России не зарегистрирован) и *хлорохин* (табл. 1) [7].

При клинически выраженном течении амелиоза и соответствующем эпидемиологическом анамнезе, когда в фекалиях обнаруживают большое число непатогенных видов амеб, также рекомендуется проводить лечение амебоцидами, так как в этих случаях высока вероятность сопутствующей инфекции *E. histolytica* [1, 22].

Неоднородность патологического процесса и клинических проявлений при амелиозе в разных географических регионах, наличие штаммов, резистентных к стандартным схемам химиотерапии 5-нитроимидазолами, обуславливают необходи-

мость варьирования схем лечения с учетом опыта, накопленного в конкретной местности [24, 25, 26].

После успешной химиотерапии абсцесса печени остаточные полости обычно исчезают в течение 2–4 мес, однако возможна персистенция полостей до 1 года.

При тяжелом течении амебной дизентерии, возможной перфорации кишечника и развития перитонита дополнительно назначают антибактериальные препараты, активные против кишечной микрофлоры [22].

Аспирация (или чрескожное дренирование) рекомендуется при больших размерах абсцесса (более 6 см), локализации его в левой доле печени или высоко в правой, при сильной боли в животе и напряжении брюшной стенки вследствие угрозы разрыва абсцесса, а также при отсутствии эффекта от химиотерапии в течение 48 ч от ее начала. Аспирация рекомендуется также при абсцессах неясной этиологии. При невозможности закрытого дренажа, а также при разрыве абсцесса и развитии перитонита проводится открытое оперативное лечение [14, 27, 28, 29].

При назначении кортикостероидов у больных амелиозом могут развиваться тяжелые осложнения вплоть до развития токсического мегаколона. В связи с этим при необходимости лечения кортикостероидами жителей эндемичных зон, у которых высок риск инфицирования *E. histolytica*, необходи-



мо предварительно обследовать на амебиоз. При сомнительных результатах целесообразно превентивное лечение амёбицидами с последующим назначением кортикостероидов [1, 17].

В настоящее время амёбиоз является практически полностью излечиваемым заболеванием при условии ранней диагностики и адекватной терапии.

### **Профилактика амёбиоза**

Источником инфекции является человек, выделяющий с фекалиями цисты *E. histolytica*. Заражение происходит при проглатывании цист с загрязненной водой и продуктами питания, обычно через сырые овощи и фрукты.

В связи со сказанным можно заключить, что основой профилактики амёбиоза являются: улучшение санитарных условий (водоснабжения и охраны пищевых продуктов), раннее выявление и лечение больных и бессимптомных носителей, санитарное просвещение [1, 30].

Наиболее эффективные пути профилактики амёбиоза – обезвреживание и удаление фекалий,

предотвращение контаминации пищи и воды, защита водоемов от фекального загрязнения (цисты амёб могут выживать в воде несколько недель).

Цисты *E. histolytica* исключительно устойчивы к химическим дезинфектантам, включая хлорирование. Кипячение воды является более эффективным методом ее обеззараживания, чем применение химических средств. Амёбы быстро погибают при высушивании, нагревании до температуры 55°C или замораживании.

Фекально-оральный механизм заражения через руки или загрязненную пищу также вполне возможен [30]. Бессимптомные носители амёб (имеются данные, что в некоторых регионах около 33% гомосексуалистов являются носителями *E. histolytica*), работающие на предприятиях питания или участвующие в приготовлении пищи в домашних условиях, должны активно выявляться и лечиться, поскольку именно они являются основными источниками заражения [1, 31].

### **Литература**

1. Amoebiasis and its control. Report of a WHO Meeting. Bulletin of the World Health Organization 1985; 63:417-26.
2. Cook G.C. Parasitic infections of the gastrointestinal tract: a worldwide clinical problem. Curr Opin Gastroenterol 1989; 5:126-39.
3. Walsh J.A. Problems in recognition and diagnosis of amoebiasis: estimation of the global magnitude of morbidity and mortality. Rev Infect Dis 1986; 8:228-38.
4. Huston C.D., Petri W.A. Amoebiasis: clinical implications of the recognition of *Entamoeba dispar*. Curr Infect Dis Rep 1999; 1:441-7.
5. Evangelopoulos A., Spanakos G., Patsoula E., et al. A nested, multiplex, PCR assay for the simultaneous detection and differentiation of *Entamoeba histolytica* and *Entamoeba dispar* in faeces. Ann Trop Med Parasitol 2000; 94:233-40.
6. Martinez-Palomo A. The pathogenesis of amoebiasis. Parasitol Today 1987; 3:111-8.
7. Sargeant P.G. The reliability of *Entamoeba histolytica* zymodemes in clinical diagnosis. Parasitol Today 1987; 3:40-3.
8. Sceto R.K., Rockey D.C. Amebic liver abscess: epidemiology, clinical features, and outcome. West J Med 1999; 170:104-9.
9. Shamsuzzama S.M., Hague R., Hasin S.K., et al. Socioeconomic status, clinical features, laboratory and parasitological findings of hepatic amoebiasis patients – a hospital based prospective study in Bangladesh. Southeast Asian J Trop Med Public Health 2000; 31:399-404.
10. Hung C.C., Chen P.J., Hsieh S.M., et al. Invasive amoebiasis: an emerging parasitic disease in patients infected with HIV in an area endemic for amoebic infection. AIDS 1999; 13:2421-8.
11. Lowther S.A., Dworkin M.S., Hanson D.L. *Entamoeba histolytica/Entamoeba dispar* infections in human immunodeficiency virus-infected patients in the United States. Clin Infect 2000; 30:955-9.
12. Espinosa-Cantellano M., Martinez-Palomo A. Pathogenesis of intestinal amoebiasis: from molecules to disease. Clin Microbiol Rev 2000; 13:318-31.
13. Que X., Reed S.L. Cysteine proteinases and the pathogenesis of amoebiasis. Clin Microbiol Rev 2000; 13:196-206.
14. Badalamenti S., Jameson J.E., Reddy K.R. Amoebiasis. Curr Treat Options Gastroenterol 1999; 2:97-103.
15. Ellyson J.H., Bezmalinovic Z., Parks S.N., Lewis F.R. Necrotizing amebic colitis: a frequently fatal complication. Am J Surg 1986; 152:21-6.
16. Shukla V.K., Roy S.K., Vaidya M.P., Mehrotra M.L. Fulminant amebic colitis. Dis Colon Rectum 1986; 29:394-401.
17. Abbas M.A., Mulligan D.C., Ramzan N.N., et al. Colonic perforation in unsuspected amebic colitis. Dig Dis Sci 2000; 45:1836-41.
18. Ciftci A.O., Karnak I., Sencak M.E., et al. Spectrum of complicated intestinal amoebiasis through resected specimens incidence and outcome. J Pediatr Surg 1999; 34:1369-73.
19. Acuna-Soto R., Maguire J.H., Wirth D.F. Gender distribution in asymptomatic and invasive amoebiasis. Am J Gastroenterol 2000; 95:1277-83.

20. Hoffner R.J., Kilaghbian T., Esekogwi V.I., Henderson S.O. Common presentation of amebic liver abscess. *Ann Emerg Med* 1999; 34:351-5.
21. Основные методы лабораторной диагностики паразитарных болезней. ВОЗ; 1994.
22. WHO Model prescribing information. 2nd ed. Geneva: WHO; 1995.
23. Shiruma T.M., Obata H., Karasawa E., et al. A recurrent case of amebic liver abscess seventeen years after the first occurrence. *Kansenshogaku Zasshi* 2000; 74: 585-8.
24. Bassilys S., Farid Z., El-Masry N.A., Michail E.M. Treatment of intestinal *E. histolytica* and *G. lamblia* with metronidazole, tinidazole and ornidazole: a comparative study. *J Trop Med Hyg* 1987; 90:9-12.
25. Bhatia S., Karnal D.R., Oak J.L. Randomized double-blind trial of metronidazole versus secnidazole in amebic liver abscess. *Indian J Gastroenterol* 1998; 17:53-4.
26. Salles J.M., Bechara C., Tavares A.M., et al. Comparative study of the efficacy and tolerability of secnidazole suspension (single dose) and tinidazole suspension (two days dosage) in the treatment of amebiasis in children. *Braz J Infect Dis* 1999; 3:80-8.
27. Akgun Y., Tacyildiz I.H., Celik Y. Amebic liver abscess: changing trends over 20 years. *World J Surg* 1999; 23:102-6.
28. Hanna R.M., Dahniya M.H., Badr S.S., El-Batagy A. Percutaneous catheter drainage in drug-resistant amoebic liver abscess. *Trop Med Int Health* 2000; 5:578-81.
29. Sharma M.P., Rai R.R., Acharya S.K., Ray J.C.S., Tandon B.N. Needle aspiration of amoebic liver abscesses. *Am. J. Trop Med Hyg* 1989; 40:384-9
30. Gatti S., Cevini C., Bermuzzi A.M., et al. Symptomatic and asymptomatic amoebiasis in two heterosexual couples. *Ann Trop Med Parasitol* 1999; 93:829-34.
31. Профилактика кишечных паразитарных инвазий и борьба с ними. Сер техн докл ВОЗ 1988; 749.

УДК 579.84.014:577.152

## **$\beta$ -Лактамазы аэробных грамотрицательных бактерий: характеристика, основные принципы классификации, современные методы выявления и типирования**

М.В. Эйдельштейн

НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии, Смоленск, Россия

$\beta$ -Лактамазы представляют обширную группу генетически и функционально различных ферментов, отличающихся способностью разрушать  $\beta$ -лактамы антибиотики, тем самым обеспечивая устойчивость к ним бактерий-продуцентов. Природная способность к продукции  $\beta$ -лактамаз характерна для многих видов микроорганизмов. Однако наибольшую значимость в последнее время приобретает широкое распространение плазмидно кодируемых  $\beta$ -лактамаз, являющихся факторами вторичной (приобретенной) резистентности у изначально чувствительных микроорганизмов.

Цель настоящего обзора – описание основных структурных и функциональных групп  $\beta$ -лактамаз аэробных грамотрицательных бактерий в соответствии с международно принятыми системами классификации. В обзоре рассмотрены наиболее часто встречающиеся у грамотрицательных возбудителей плазмидные  $\beta$ -лактамы TEM- и SHV-типа, их эволюция и роль в формировании устойчивости к различным  $\beta$ -лактамам, а также современные методы их диагностики и типирования.

**Ключевые слова:**  $\beta$ -лактамазы, антибиотикорезистентность, грамотрицательные бактерии, микробиологическая диагностика.

## **$\beta$ -Lactamases of Aerobic Gram-Negative Bacteria: Description, Principles of Classification, Methods of Detection and Typing**

M.V. Edelstein

Institute of Antimicrobial Chemotherapy of Smolensk State Medical Academy, Smolensk, Russia

$\beta$ -Lactamases are represented by extensive range of genetically and functionally different enzymes that are able to destroy  $\beta$ -lactams that leads to development of resistance to these antibiotics in  $\beta$ -lactamases producing bacteria. Intrinsic production of  $\beta$ -lactamases is a common phenomenon for wide range of microorganisms. But at the present time the wide spread of plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases that leads to secondary (acquired) resistance to  $\beta$ -lactams becoming more common.

The aim of this review is to describe the main structural and functional groups of  $\beta$ -lactamases of aerobic Gram-negative bacteria, with especial attention to plasmid-mediated TEM- and SHV-types  $\beta$ -lactamases, their evolution and role in the development of resistance to different  $\beta$ -lactams. The recent methods of detection and typing of  $\beta$ -lactamases are described.

**Key words:**  $\beta$ -lactamases, antimicrobial resistance, Gram-negative bacteria, microbiological diagnostics.

---

Контактный адрес:

Михаил Владимирович Эйдельштейн  
214019, Смоленск, Россия, а/я 5  
Эл. почта: me@antibiotic.ru

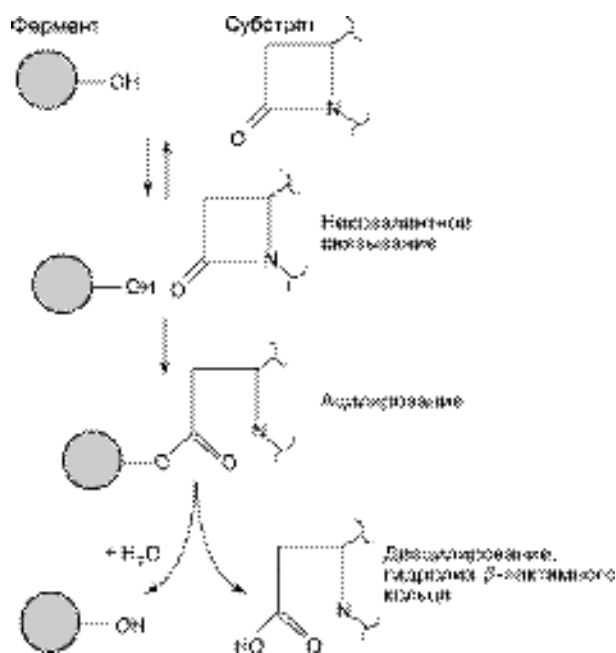
## 1. Механизм действия $\beta$ -лактамаз

Согласно определению Комитета по номенклатуре Международного биохимического общества  $\beta$ -лактамазы классифицируются как «ферменты, осуществляющие гидролиз амидов, амидинов и других С–N связей ..., выделенные на основании субстрата – ... циклических амидов» [1].

Термин « $\beta$ -лактамазы» является, таким образом, функциональным и объединяет различные бактериальные ферменты, способные расщеплять  $\beta$ -лактамы антибиотики, содержащие в своей структуре циклическую амидную связь.

Большинство известных  $\beta$ -лактамаз проявляет выраженную структурную гомологию с *пенициллинсвязывающими белками* (ПСБ), что свидетельствует об эволюционной взаимосвязи между ферментами этих групп [2]. Подобно ПСБ  $\beta$ -лактамазы, содержащие остаток серина в активном центре, взаимодействуют с  $\beta$ -лактамами антибиотиками с образованием эфирного комплекса. Однако в случае  $\beta$ -лактамаз этот комплекс быстро расщепляется с высвобождением нативного фермента и инактивированной молекулы субстрата (рис. 1).

Различия между  $\beta$ -лактамазами и ПСБ не всегда отчетливы, поскольку многие  $\beta$ -лактамазы могут образовывать стабильные эфиры с  $\beta$ -лактамами, выступающими в роли ингибиторов, а некоторые ПСБ обладают способностью к быстрому деацили-



**Рис. 1.** Механизм расщепления  $\beta$ -лактамных антибиотиков  $\beta$ -лактамазами, содержащими серин в активном центре

рованию, проявляя слабую гидролитическую активность в отношении отдельных  $\beta$ -лактамных антибиотиков [3].

Сравнительно небольшое число ферментов, известных как металло- $\beta$ -лактамазы, гидролизуют  $\beta$ -лактаманное кольцо с участием ионов цинка, находящихся в активном центре [4]. Наиболее существенной особенностью  $\beta$ -лактамаз этого типа является их активность в отношении карбапенемов [5].

## 2. Разнообразие и классификация $\beta$ -лактамаз

С момента открытия  $\beta$ -лактамаз в 1940 г., когда Е.Р. Abraham и Е. Chain описали процесс инактивации пенициллина в бесклеточном экстракте культуры кишечной палочки [6], и до настоящего времени различными исследователями выявлено не менее 300 ферментов, отличающихся структурно и функционально, способных осуществлять гидролиз  $\beta$ -лактаманного кольца. За исключением нескольких видов клинически значимых микроорганизмов, среди которых следует отметить *Streptococcus pneumoniae* и *Helicobacter pylori*,  $\beta$ -лактамазы встречаются у подавляющего большинства бактериальных возбудителей инфекций [2].

Важнейшими свойствами  $\beta$ -лактамаз, определяющими их разнообразие, являются:

- 1) субстратная специфичность (способность к преимущественному гидролизу  $\beta$ -лактамов определенных групп – пенициллинов, цефалоспоринов, монобактамов, карбапенемов);
- 2) чувствительность к действию ингибиторов;
- 3) локализация кодирующих генов (хромосомная или плазмидная) и характер их экспрессии (конститутивный или индуцибельный).

Перечисленные функциональные особенности послужили основой создания различных систем классификации  $\beta$ -лактамаз. Актуальность дифференциации ферментов, предпочтительно гидролизующих пенициллины (пеницилиназы) или цефалоспорины (цефалоспорины), впервые отметили Р.С. Fleming и соавт. в 1963 г. [7]. Система классификации, предложенная Т. Sawai и соавт. в 1968 г., предусматривала использование иммунных сывороток в качестве дополнительного критерия дифференциации пеницилиназ, цефалоспориноз и ферментов с широким субстратным спектром.

М.Н. Richmond и R.V. Sykes разделили все известные в начале 70-х годов  $\beta$ -лактамазы грамотрицательных микроорганизмов на 5 групп с учетом субстратного спектра, чувствительности к ингибиторам и отчасти локализации кодирующих генов [8]. В 1976 г. R. V. Sykes и M. Matthew расширили эту классификацию, подчеркнув роль плазмидных

$\beta$ -лактамаз, которые могли быть дифференцированы на основании данных изоэлектрического фокусирования [9]. В функциональной схеме S. Mitsuhashi и M. Inoue (1981) была выделена дополнительная группа «цефуросим-гидролизующих» ферментов [10].

Параллельно с развитием функциональных подходов в классификации R. Ambler в 1980 г. использовал результаты сравнения первичной структуры  $\beta$ -лактамаз для описания молекулярных классов: сериновых ферментов (класс А), включая пенициллиназу *Staphylococcus aureus*, и металло- $\beta$ -лактамаз (класс В) *Bacillus cereus* [11].

По мере накопления данных об аминокислотной последовательности  $\beta$ -лактамаз были также описаны два дополнительных класса ферментов, содержащих серин в активном центре: класс С-цефалоспоринаяз и класс D-оксациллиназ грамотрицательных бактерий [4]. В последнее время значение структурной классификации возросло в связи с расширением использования молекулярных методов диагностики и типирования  $\beta$ -лактамаз.

Прообразом современной классификации явилась предложенная К. Bush в 1989 г. система разделения  $\beta$ -лактамаз на 3 основные группы, в которой впервые предпринята попытка провести корреляцию между функциональными особенностями (спектром активности, чувствительностью к ингибиторам) и молекулярной структурой ферментов, продуцируемых различными видами микроорганизмов. Эта система была уточнена и дополнена в 1995 г. К. Bush, G. Jacoby и A. Medeiros с учетом новых ферментов, описанных у энтеробактерий, и в настоящее время принята большинством исследователей [4, 12].

### **2.1. Цефалоспоринаязы, слабо ингибируемые клавулановой кислотой (группа 1)**

Группа 1 в функциональной классификации К. Bush, G. Jacoby и A. Medeiros включает ферменты грамотрицательных бактерий, соответствующие молекулярному классу С. Предпочтительными субстратами для них являются цефалоспорины. Клавулановая кислота, сульбактам и тазобактам обладают незначительной ингибирующей активностью в отношении  $\beta$ -лактамаз данного типа.

Цефалоспоринаязы, как правило, являются хромосомно-кодируемыми и распространены среди многих видов семейства *Enterobacteriaceae*, а также у отдельных неферментирующих грамотрицательных микроорганизмов, включая *Pseudomonas aeruginosa* [4].

Влияние  $\beta$ -лактамаз класса С на фенотип резистентности различных видов бактерий определяется

характером экспрессии соответствующих генов (*ampC*). Для штаммов *Escherichia coli* и *Shigella* spp. характерен низкий уровень продукции хромосомных цефалоспоринаяз, который может быть обнаружен с помощью чувствительных тестов, однако не обеспечивает устойчивость к цефалоспорином и пенициллинам [3].

Продукция аналогичных ферментов у *Enterobacter* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter freundii*, *Morganella morganii*, *Providencia stuartii* и *Providencia rettgeri* носит индуцибельный характер. В отсутствие антибиотика цефалоспоринаязы вырабатываются в следовых количествах, однако многие  $\beta$ -лактамазы способны вызывать функциональную дерепрессию генов *ampC* и быстрое увеличение синтеза ферментов.

Чувствительность «индуцибельных» штаммов к тем или иным антибиотикам зависит, таким образом, не только от эффективности их расщепления  $\beta$ -лактамазами, но и от способности антибиотиков усиливать экспрессию *ampC*.

Ампициллин и цефалоспорины I поколения, являясь сильными индукторами, быстро разрушаются под действием цефалоспоринаяз и поэтому не обладают активностью в отношении перечисленных видов бактерий. Карбоксипенициллины, уреидопенициллины, цефалоспорины II–III поколений и монобактамы также являются лабильными, однако сохраняют активность, поскольку не вызывают индукцию.

Приобретенная резистентность к этим препаратам обычно развивается вследствие мутаций в локусе *ampD*, приводящих к постоянной гиперпродукции хромосомных цефалоспоринаяз. Карбапенемы и цефалоспорины IV поколения вследствие своей стабильности остаются эффективными как в отношении «индуцибельных», так и гиперпродуцирующих штаммов [13].

У редких штаммов *E. coli* и *Klebsiella pneumoniae* были выявлены плазмидно-кодируемые  $\beta$ -лактамазы класса С: MIR-1, BIL-1, MOX-1, FOX-1, гены которых проявляют гомологию с *ampC* *Enterobacter* spp. и *C. freundii* и экспрессируются конститутивно [3].

### **2.2. Пенициллиназы, цефалоспоринаязы и $\beta$ -лактамазы широкого спектра, ингибируемые клавулановой кислотой (группа 2)**

Группа 2 является наиболее обширной и объединяет ферменты, относящиеся к молекулярным классам А и D (рис. 2). На основании субстратных различий  $\beta$ -лактамазы, входящие в эту группу, разделены на 8 функциональных категорий.

Группа 2а включает в основном плазмидные





Рис. 2. Соответствие структурной и функциональной классификации  $\beta$ -лактамаз

пенициллиназы грамположительных микроорганизмов *Staphylococcus* spp. и *Bacillus* spp. Стафилококковые  $\beta$ -лактамазы эффективно разрушают природные и полусинтетические пенициллины, кроме группы оксациллина, их функция подавляется ингибиторами – клавулановой кислотой, сульбактамом и тазобактамом [4].

К группе 2b относятся наиболее распространенные среди штаммов *E. coli*, *Proteus mirabilis* и *K. pneumoniae* плазмидные  $\beta$ -лактамазы TEM-1, TEM-2 и SHV-1. Предпочтительными субстратами для них являются пенициллины, включая ампициллин, амоксициллин, тикарциллин и карбенициллин. Уреидопенициллины, цефалоспорины I поколения и цефоперазон расщепляются ферментами данной группы с меньшей эффективностью [14]. Поэтому TEM-1, TEM-2 и SHV-1 часто описывают как пенициллиназы широкого спектра.

Группа 2be объединяет более 80 производных TEM-1, TEM-2 и SHV-1, известных как  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра (extended-spectrum  $\beta$ -lactamases – ESBL), которые обладают способностью расщеплять цефалоспорины III–IV поколений и монобактамы наряду с ранними цефалоспоридами и пенициллинами.

Кроме того, к этой же функциональной группе могут быть отнесены плазмидные цефотаксимазы Toho-1, CTX-M-1 – CTX-M-16, принадлежащие к молекулярному классу А и проявляющие наиболее выраженную гомологию с хромосомными  $\beta$ -лактамазами *Kluyvera ascorbata*, *Klebsiella oxytoca*, *Proteus vulgaris* и *Citrobacter diversus* [15].

Среди различных представителей группы 2be отмечается выраженная субстратная предпочтительность к отдельным цефалоспоридам расширенного спектра, например цефтазидиму или цефотаксиму, однако продукция подавляющего большинства ESBL может вызывать резистентность ко всем оксимино- $\beta$ -лактамам [3]. Карбапенемы и цефамицины не входят в спектр антибиотиков, разруша-

емых ESBL. Ферменты этой группы также проявляют чувствительность к ингибиторам.

Группа 2br, впервые выделенная в системе классификации К. Bush, G. Jacoby и А. Medeiros, представлена в основном производными TEM  $\beta$ -лактамаз, отличительной особенностью которых является устойчивость к ингибиторам. Большинство ингибиторорезистентных TEM (IRT) ферментов, а также единственная  $\beta$ -лактамаза SHV-типа (SHV-10), входящая в группу 2br, выявлены у клинических штаммов *E. coli* [16, 17, 18].

Группа 2c соответствует карбенициллиназам грамотрицательных бактерий, которые принадлежат к молекулярному классу А. Ферменты PSE-1, PSE-3 и PSE-4, относящиеся к этой группе, обладают более высокой скоростью гидролиза карбенициллина, чем бензилпенициллина, и подавляются клавулановой кислотой. Сходные свойства проявляют также  $\beta$ -лактамазы BRO-1 и BRO-2 *Moraxella catarrhalis* и  $\beta$ -лактамаза SAR-1 *Vibrio cholerae* [12].

Оксациллиназы (группа 2d) OXA-1 – OXA-9, OXA-10 (PSE-2) и OXA-11 наиболее эффективно расщепляют клоксациллин и оксациллин. Их активность слабо подавляется ингибиторами, вследствие чего оксациллиназы могут вызывать устойчивость энтеробактерий к амоксициллину/клавулановой кислоте [3].

Группа 2e включает цефалоспорины, характеризующиеся активностью в отношении оксиминоцефалоспоринов и высокой чувствительностью к клавулановой кислоте. Представителями этой группы ферментов являются индуцибельные хромосомные  $\beta$ -лактамазы (цефуроссимазы) *P. vulgaris* и *C. diversus*, а также хромосомные  $\beta$ -лактамазы *Bacteroides* spp. и L2 *Stenotrophomonas maltophilia* [4].

Редкие  $\beta$ -лактамазы молекулярного класса А, гидролизующие карбапенемы и проявляющие чувствительность к клавуланату NMC-A, Imi-1 *Enterobacter cloacae* и Sme-1 *Serratia marcescens*, объединены в группу 2f [4].

### 2.3. Металло- $\beta$ -лактамазы (группа 3)

Цинксодержащие  $\beta$ -лактамазы, относящиеся к молекулярному классу В и функциональной группе 3 в классификации К. Bush, G. Jacoby и А. Medeiros, проявляют гидролитическую активность в отношении подавляющего большинства  $\beta$ -лактамов, включая карбапенемы. Ферменты данного типа ингибируются соединениями, хелатирующими цинк, например ЭДТА.

Индукцибельные хромосомно-кодируемые металло- $\beta$ -лактамазы описаны у *S. maltophilia* (L1),



*Aeromonas* spp. (A2, CphA), *Burkholderia cepacia* (PCM-1) и *Bacteroides fragilis* (CcrA) [5]. У отдельных штаммов *S. marcescens*, *P. aeruginosa* и *B. fragilis* были выявлены Zn<sup>2+</sup>-зависимые карбапенемазы, гены которых имеют плазмидную локализацию [3].

### 3. Распространенность TEM и SHV β-лактамаз и их роль в развитии резистентности к β-лактамам антибиотикам

#### 3.1. β-Лактамазы широкого спектра TEM-1, TEM-2 и SHV-1

Особое значение плазмидных β-лактамаз TEM- и SHV-типов связано с их широким распространением среди грамотрицательных бактерий. По данным различных исследователей, TEM-1 встречается у 73–94% ампициллинорезистентных штаммов *E. coli* и составляет около 80% всех плазмидных β-лактамаз энтеробактерий [19, 20, 21]. Продукция этого фермента отмечается не только у многих видов семейства *Enterobacteriaceae*, но и у представителей других групп микроорганизмов, например *Haemophilus*, *Neisseria*, *Pseudomonas*, *Acinetobacter* и *Vibrio* spp. [3, 22, 23].

Распространенность TEM-1 наиболее вероятно связана с локализацией генов, кодирующих этот фермент, в составе транспозонов (*Tn2*, *Tn3*), обеспечивающих возможность их перемещения между конъюгативными плазмидами с широким кругом хозяев [24], однако данное обстоятельство не является единственным объяснением доминирования TEM-1.

TEM-2 отличается от TEM-1 заменой единственного аминокислотного остатка (Глн<sub>39</sub>→Лиз), которая проявляется в основном в повышении изоэлектрической точки данного фермента (pI 5,4→5,6) и существенно не изменяет спектр его активности [3, 22]. Ген, кодирующий TEM-2, также входит в состав транспозона *Tn1*, который практически идентичен *Tn3*, за исключением точечной мутации в промоторной области, усиливающей транс-

крипцию *bla*<sub>TEM-2</sub>, и 5 нуклеотидных замен в структурной части *bla*<sub>TEM</sub> гена, 4 из которых являются молчащими [25].

Тем не менее, несмотря на минимальные генетические и фенотипические различия между TEM-1 и TEM-2, частота встречаемости последнего фермента не превышает 4% [26]. Продукция TEM-2 является наиболее характерной для штаммов *P. mirabilis* [17, 27, 28].

Наиболее родственные в структурном и функциональном отношении ферменты, относящиеся к генетической группе SHV, в большей степени распространены среди микроорганизмов рода *Klebsiella* [22, 29], хотя плазмидно-кодируемые β-лактамазы этой группы также встречаются у представителей других родов семейства *Enterobacteriaceae*. Ген SHV-1 может иметь как плазмидную, так и хромосомную локализацию у штаммов *K. pneumoniae* и не связан с мобильными генетическими элементами [2].

Аминокислотные последовательности ферментов TEM-1 и SHV-1 гомологичны на 65% [30]. Оба фермента обладают сходной пространственной структурой, характерной для β-лактамаз класса А [11, 31, 32], и близкими спектрами ферментативной активности (табл. 1).

Экспрессия генов TEM и SHV β-лактамаз осуществляется конститутивно, однако уровень продукции ферментов определяется эффективностью промоторов и копийностью плазмид, с которыми связаны гены [33, 34]. Продукция даже небольшого количества TEM-1, TEM-2 или SHV-1 приводит к формированию высокого уровня резистентности (МПК ≥ 56 мкг/мл) к амино- и карбоксипеницилинам.

Каталитическая активность TEM пенициллиназ и SHV-1 в отношении уреидопенициллинов, цефалоспоринов I поколения и цефоперазона выражена меньше. Наблюдаемая у различных штаммов-продуцентов вариabельность значений МПК этих антибиотиков (8–512 мкг/мл – у пиперациллина,

Таблица 1. Характеристика β-лактамаз широкого спектра TEM-1, TEM-2 и SHV-1 [4]

Фермент	Молекулярная масса, кДа	pI*	Относительная скорость гидролиза, %								IC <sub>50</sub> , μM**			
			PEN	AMP	CARB	LOR	LOT	TAX	TAZ	ATM	CA	SUL	TZB	
TEM-1	28,9	5,4	100	100	10	140	20	0,07	0,01	0,3	0,09	6,1	0,04	
TEM-2	28,9	5,6	100	100	6	120	9,4	0,08	<0,01	0,4	0,18	8,7	0,05	
SHV-1	28,8	7,6	100	150	6,3	48	6,5	0,18	0,02	0,38	0,03	17	0,14	

**Примечание.** \* pI – изоэлектрическая точка фермента, \*\* IC<sub>50</sub> – концентрация, подавляющая 50% активности фермента. PEN – пенициллин, AMP – ампициллин, CARB – карбенициллин, LOR – цефалоридин, LOT – цефалотин, TAX – цефотаксим, TAZ – цефтазидим, ATM – азтреонам, CA – clavulanовая кислота, SUL – сульбактам, TZB – тазобактам.

16–256 мкг/мл – у цефалотина, 0,5–64 мкг/мл – у цефоперазона) определяется главным образом количеством вырабатываемого фермента [3].

Клавулановая кислота, сульбактам и тазобактам обладают различной ингибирующей способностью в отношении пеницилиназ. Сульбактам – наименее эффективный ингибитор, поэтому *in vitro* чувствительность к комбинации ампициллин/сульбактам ( $\leq 4$  мкг/мл) наблюдается лишь у 25% пенициллин-назопродуцирующих штаммов *E. coli*. В то же время чувствительность к амоксициллину/клавуланату ( $\leq 4$  мкг/мл), тикарциллину/клавуланату ( $\leq 6/2$  мкг/мл) и пиперациллину/тазобактаму ( $\leq 6/4$  мкг/мл) отмечается соответственно у 60, 70 и более 90% штаммов, экспрессирующих *bla*<sub>TEM-1</sub> [3].

Продукция  $\beta$ -лактамаз TEM-1, TEM-2 и SHV-1 не вызывает устойчивость к цефамидинам, оксимино-аминоазиололид-цефалоспорином, монобактамам и карбапенемам, поскольку препараты перечисленных групп практически не расщепляются данными ферментами [3, 4, 22].

### 3.2. Эволюция $\beta$ -лактамаз расширенного спектра. Структурные и функциональные особенности ESBL

Внедрение в начале 80-х годов прошлого века в широкую клиническую практику цефалоспоринов III поколения (цефотаксима, цефтазидима), которые эффективно подавляют штаммы, продуцирующие классические плазмидные пеницилиназы, в течение короткого периода привело к появлению и широкому распространению производных TEM и SHV, способных эффективно связывать и разрушать оксимино-аминоазиололид- $\beta$ -лактамы. Эти ферменты получили название ESBL –  $\beta$ -лактамаз расширенного спектра [2].

Первый клинический штамм, продуцирующий ESBL, был выделен в 1982 г. в Англии [22]. Этот штамм *K. oxytoca* явился причиной развития ряда инфекционных осложнений в неонатологическом отделении в Ливерпуле. Изначально выделенный штамм был резистентным к гентамицину, но чувствительным к цефтазидиму и продуцировал  $\beta$ -лактамазу TEM-1.

В ходе последующей терапии с использованием цефтазидима штамм приобрел резистентность к данному препарату. Ген резистентности был локализован в составе 141-тпн конъюгативной плазмиды. Практически он идентичен TEM-1, за исключением замены одного нуклеотида в положении 609.

Замена соответствующей аминокислоты (Arg<sub>164</sub>→Ser) в активном центре фермента привела к появлению новой  $\beta$ -лактамазы, способной рас-

щеплять цефтазидим и получившей впоследствии название TEM-12 [36, 37]. Аналогичный фермент найден у цефтазидиморезистентных штаммов *E. coli* в США и *K. oxytoca* в Англии [37].

В 1983 г. в Западной Германии были выделены 3 штамма *K. pneumoniae* и один – *S. marcescens*, способные передавать при конъюгации резистентность к цефотаксиму [37]. Найденная у этих штаммов плазмидная  $\beta$ -лактамаза оказалась производной SHV-1 и была названа SHV-2. Так же, как и в случае TEM-12, новый фермент отличался от предшественника заменой единственного аминокислотного остатка (Gли<sub>238</sub>→Сер) [38].

В настоящее время различные ESBL, производные TEM-1, TEM-2 и SHV-1, отличающиеся заменами одной и более аминокислот, широко распространены в странах Европы, Азии, Африки, Северной и Южной Америки и в Австралии [2]. По данным многих авторов, встречаемость ESBL у госпитальных штаммов *K. pneumoniae* составляет в различных странах от 7 до 75% [3, 39, 40]. В России в отдельных стационарах частота выявления этих ферментов у клебсиелл достигает 90% [41].

Распространение ESBL часто носит эпидемический характер, при этом доминируют определенные штаммы или ферменты в масштабах как отдельных центров, так и обширных географических зон. Так, например, в Бельгии и Франции преобладающими являются штаммы *K. pneumoniae*, относящиеся к одному серотипу K25 и продуцирующие SHV-4 [42],  $\beta$ -лактамазы TEM-10 и TEM-26 в основном распространены у различных штаммов в США [3]. Случаи конвергентной эволюции ESBL и *de novo* образования идентичных ферментов от разных предшественников также описаны в литературе [43, 44].

Наиболее частые продуценты ESBL – штаммы *K. pneumoniae* [3]. Причины преобладания ESBL у клебсиелл по сравнению с другими представителями семейства *Enterobacteriaceae*, например *E. coli*, остаются невыясненными, поскольку пока не найдено различий в механизмах экспрессии и скорости накопления мутаций в генах TEM и SHV  $\beta$ -лактамаз у *E. coli* и *K. pneumoniae* [22]. Лечение инфекций, вызванных ESBL-продуцирующими штаммами *K. pneumoniae*, часто осложняется их множественной антибиотикорезистентностью, поскольку гены ESBL обычно расположены в составе больших «полирезистентных» плазмид [45].

Описано около 60 отличающихся по спектру мутаций ESBL-производных TEM-типа и более 20 ESBL, относящихся к группе SHV. Для большинства этих ферментов имеются исчерпывающие данные о характере аминокислотных замен, определяющих расширенный спектр активности (табл. 2).

Отдельные мутации, например замена Гли<sub>238</sub>→Сер, обнаруживаемая как у TEM-, так и SHV-производных, значительно повышают каталитическую активность в отношении цефтазидима, цефотаксима и азтреонама [22, 30]. Продукция β-лактамаз TEM-3, TEM-4, TEM-8, TEM-15, TEM-19, SHV-2, SHV-3, SHV-4 и SHV-5, содержа-

щих Сер-238, приводит к формированию высокого уровня резистентности (МПК ≥ 6 мкг/мл) ко всем оксиимино-β-лактамам [3].

Другие мутации, например Арг<sub>164</sub>→Сер у TEM-7, TEM-10, TEM-12 и TEM-26, вызывают преимущественное повышение устойчивости к цефтазидиму (МПК – 4–256 мкг/мл), оставляя значения МПК

Таблица 2. Спектр мутаций у ESBL TEM- и SHV-типов [46]

Фермент	Позиции аминокислотных замен относительно TEM-1*															pI
	21	39	42	51	92	104	153	164	182	237	238	240	244	265	268	
TEM-1	L	Q	A	L	G	E	H	R	M	A	G	E	R	T	S	5,4
TEM-3		K				K					S					6,3
TEM-4	F					K					S			M		5,9
TEM-5							S		T			K				5,55
TEM-6						K		H								5,9
TEM-7		K					S									5,4
TEM-8		K				K	S				S					5,9
TEM-9	F					K	S							M		5,5
TEM-10							S					K				5,6
TEM-11		K					H									5,6
TEM-12							S									5,25
TEM-13		K												M		5,6
TEM-15						K					S					6,0
TEM-16		K				K		H								6,3
TEM-17						K										
TEM-18		K				K										6,3
TEM-19											S					5,4
TEM-20								T			S					5,4
TEM-21		K				K	R				S					6,4
TEM-22		K				K				G	S					6,3
TEM-24		K				K		S		T		K				6,5
TEM-25	F										S			M		5,3
TEM-26						K		S								5,6
TEM-27							H					K		M		5,9
TEM-28							H					K				6,1
TEM-29							H									5,42
TEM-42		K	V								S	K		M		5,8
TEM-43						K		H	T							6,1
TEM-46		K				K		S				K				6,5
TEM-47											S	K		M		6,0
TEM-48	F										S	K		M		6,0
TEM-49	F										S	K		M	G	6,0
TEM-52						K		T			S					6,0
TEM-53	F						S									
TEM-54													L			
TEM-56		K				K	R									6,4
TEM-57					D											5,2
TEM-60		K		P		K		S								6,4
TEM-61		K						H				K				6,5
TEM-63	F					K		S	T							5,6
TEM-66		K			D	K					S					6,0

	Позиция аминокислотных замен относительно SHV-1*											
	8	35	43	54	140	179	192	193	205	238	240	
SHV-1	I	L	R	G	A	D	K	L	R	G	E	7,6
SHV-2										S		7,6
SHV-2a		Q								S		7,6
SHV-3									L	S		7,0
SHV-4									L	S	K	7,8
SHV-5										S	K	8,2
SHV-6						A						7,6
SHV-7	F		S							S	K	7,6
SHV-8						N						7,6
SHV-9				Del	R		N	V		S	K	8,2
SHV-11		Q										7,6
SHV-12		Q								S	K	8,2

**Примечание.** \*Нумерация аминокислотных остатков согласно R.P. Ambler [47]. Обозначения аминокислот: А – аланин, С – цистеин, D – аспарагиновая кислота, E – глутаминовая кислота, F – фенилаланин, G – глицин, H – гистидин, K – лизин, L – лейцин, M – метионин, P – пролин, Q – глутамин, R – аргинин, S – серин, T – треонин, V – валин, I – изолейцин. Del – делеция.

цефотаксима, цефтриаксона и цефпиромы для большинства штаммов *E. coli* и *K. pneumoniae* на уровне 0,06–4 мкг/мл [3]. Вместе с тем продукция значительного количества ферментов со «слабой» ESBL-активностью, особенно у штаммов с пониженной проницаемостью наружной клеточной мембраны, приводит к существенно более высокому уровню резистентности и, что наиболее важно, может являться причиной клинической неэффективности цефалоспоринов III–IV поколений [48].

Таким образом, ESBL-продуцирующие штаммы рассматриваются как биологически устойчивые ко всем оксимино- $\beta$ -лактамам независимо от наблюдаемого *in vitro* уровня резистентности [3].

### 3.3. Ингибиторорезистентные $\beta$ -лактамазы и ферменты, содержащие мутации, характерные для ингибиторорезистентных TEM ферментов и ESBL

Наряду с ферментами, проявляющими расширенный спектр активности, семейства TEM и SHV  $\beta$ -лактамаз включают дополнительное число производных, обладающих устойчивостью к ингибиторам: клавулановой кислоте, сульбактаму и тазобактаму. За исключением SHV-10 все известные ингибиторорезистентные  $\beta$ -лактамазы класса А являются вариантами TEM-1 и TEM-2 (табл. 3).

IRT ферменты впервые описаны у штаммов *E. coli* в 1992 г. [49]. Впоследствии различные варианты IRT, в основном отличающиеся заменами аминокислотных остатков в позициях 69, 165, 182, 244, 275 и 276, были обнаружены у госпитальных и внебольничных штаммов *E. coli* [17, 50, 51], а также у отдельных клинических изолятов *P. mirabilis* [52] и *Klebsiella* spp. [53, 54]. Все энтеробактерии, проду-

цирующие IRT, были выделены в странах Западной Европы – Испании, Франции, Великобритании и Греции [17].

Согласно результатам обзорного исследования, проведенного во Франции, наиболее частыми продуцентами IRT являются уропатогенные штаммы *E. coli*, что, вероятно, объясняется широким использованием ингибиторозащищенных пенициллинов для лечения инфекций мочевыводящих путей [51].

Устойчивость к ингибиторам может развиваться путем независимого накопления аналогичных мутаций у разных TEM ферментов. Так, ингибиторорезистентные  $\beta$ -лактамазы *P. mirabilis* TEM-44 и TEM-65 являются производными TEM-2, наиболее распространенной у данного вида микроорганизмов пенициллиназы, и образуются в результате мутаций Arg<sub>244</sub>→Сер и Arg<sub>244</sub>→Цис, также характерных для ферментов TEM-30 и TEM-31, предшественником которых является TEM-1 [17, 52].

Несмотря на резистентность к пенициллину, продуценты IRT обычно проявляют чувствительность к цефалоспорином, включая препараты I поколения (цефалотин). Уровень их устойчивости к пиперациллину/тазобактаму обычно ниже, чем к амоксициллину/клавулановой кислоте и ампициллину/сульбактаму, главным образом из-за более высокой стабильности пиперациллина [3].

Три фермента, описанные в настоящее время, объединяют в своей структуре мутации, характерные для ESBL и ингибиторорезистентных производных. SHV-10 является производной  $\beta$ -лактамазы расширенного спектра SHV-9 и отличается единственной аминокислотной заменой (Сер<sub>130</sub>→Гли), в результате которой фермент практически полностью утрачивает активность в отно-

Таблица 3. Спектр мутаций у ингибиторорезистентных  $\beta$ -лактамаз TEM- и SHV-типов [46]

Фермент	Позиции аминокислотных замен относительно TEM-1*												pI		
	39	69	104	130	165	182	238	240	244	262	265	275		276	
TEM-1	Q	M	E	S	W	M	G	E	R	V	T	R	N	5,4	
TEM-30 (IRT-2)									S					5,2	
TEM-31 (IRT-1)									C					5,2	
TEM-32 (IRT-3)		I				T								5,4	
TEM-33 (IRT-5)		L												5,4	
TEM-34 (IRT-6)		V												5,4	
TEM-35 (IRT-4)		L											D	5,2	
TEM-36 (IRT-7)		V											D	5,2	
TEM-37 (IRT-8)		I											D	5,2	
TEM-38 (IRT-9)		V									L			5,2	
TEM-39 (IRT-10)		L			R								D	5,4	
TEM-40 (IRT-11)		I												5,4	
TEM-44 (IRT-13)	K								S					5,4	
TEM-45 (IRT-14)		L										Q		5,2	
TEM-50 (CMT-1)		L	K				S						D	5,6	
TEM-51 (IRT-15)									H					5,2	
TEM-58									S	I				5,2	
TEM-59 (IRT-17)	K			G										5,6	
TEM-65	K									C				5,4	
TEM-68 (CMT-2)							S	K			M	L		5,7	
		Позиции аминокислотных замен относительно SHV-1*													
		54		130		140		192		193		238		240	
SHV-1		G		S		A		K		L		G		E	7,6
SHV-10		Del		G		R		N		V		S		K	8,2

**Примечание.** \*Нумерация аминокислотных остатков согласно R.P. Ambler [47]. Обозначения аминокислот: А – аланин, С – цистеин, D – аспарагиновая кислота, E – глутаминовая кислота, G – глицин, H – гистидин, K – лизин, L – лейцин, M – метионин, Q – глутамин, R – аргинин, S – серин, T – треонин, V – валин, I – изолейцин, N – аспарагин. Del – делеция.

шении цефалоспоринов и одновременно приобретает устойчивость к ингибиторам [18].

$\beta$ -Лактамаза TEM-50 (CMT-1) содержит мутации, обнаруживаемые у IRT-4 (Лей-164, Асп-276) и TEM-15 (Лиз-104, Сер-238). В результате их комбинирования TEM-50 проявляет кинетические параметры ( $K_m$ ,  $k_{cat}$  и  $IC_{50}$ ) на уровне средних значений соответствующих констант IRT-4 и TEM-15 и обеспечивает устойчивость штамма-продуцента (*E. coli* GR102) к невысоким концентрациям амоксицилина/клавулановой кислоты (МПК 64 мкг/мл) и цефтазидима (МПК 1 мкг/мл) [55].

$\beta$ -Лактамаза TEM-68 (CMT-2) объединяет мутации, характерные для TEM-47 (Сер-238, Лиз-240, Мет-265) и IRT-9 (Лей-275). При этом гидролитическая активность TEM-68 в отношении цефалоспоринов расширенного спектра сопоставима с активностью TEM-47, но в меньшей степени подавляется клавулановой кислотой и тазобактамом [56].

Возможно, что эволюционно более эффективным путем формирования одновременной устойчи-

вости к ингибиторозащищенным пенициллинам и оксиимино- $\beta$ -лактамам является продукция нескольких  $\beta$ -лактамаз, которая неоднократно отмечалась у клинических штаммов энтеробактерий [2, 3, 57].

## 4. Современные методы диагностики и типирования $\beta$ -лактамаз

### 4.1. Фенотипические методы

#### 4.1.1. Хромогенные тесты для обнаружения продукции $\beta$ -лактамаз

Продукция  $\beta$ -лактамаз у многих видов микроорганизмов может быть выявлена с помощью чувствительных хромогенных тестов, основанных на использовании специальных субстратов, изменяющих окраску в результате расщепления, или на наблюдении реакции, сопряженной с процессом гидролиза  $\beta$ -лактамов [12].

Наиболее широко используемым хромогенным



субстратом является нитроцефин – цефалоспорин, расщепляемый большинством  $\beta$ -лактамаз с образованием продукта, окрашенного в интенсивно-красный цвет [58]. Наблюдение реакции гидролиза нитроцефина в растворе или на бумажных дисках, инокулированных исследуемой бактериальной культурой, является наиболее быстрым, чувствительным и специфичным тестом на наличие  $\beta$ -лактамаз.

Альтернативные методы детектирования  $\beta$ -лактамазной активности включают йодометрические и ацидометрические тесты. Первый вид исследований основан на способности продуктов гидролиза  $\beta$ -лактаманых антибиотиков восстанавливать йод до йодида, вызывая обесцвечивание йодокрахмального комплекса [12]. Изменение окраски кислотно-основных индикаторов, например бромкрезолового пурпурного, вызванное появлением дополнительной карбоксильной группы при расщеплении  $\beta$ -лактаманого кольца, является основой использования ацидометрических методов [12].

Для некоторых видов возбудителей, особенно *Haemophilus* spp. и *Neisseria* spp., выявление продукции  $\beta$ -лактамаз с помощью хромогенных тестов считается основным предиктором чувствительности к  $\beta$ -лактамам [3]. Однако для большинства микроорганизмов, в первую очередь для представителей семейства *Enterobacteriaceae*, важно не столько наличие  $\beta$ -лактамаз, сколько тип продуцируемых ферментов, который определяет спектр антибиотикорезистентности.

#### 4.1.2. Анализ антибиотикограммы

Первичная информация о характере  $\beta$ -лактамаз может быть получена на основании анализа профилей чувствительности штаммов-продуцентов. В частности, при наличии у клинических штаммов *K. pneumoniae* резистентности к пенициллинам и цефалоспорином I–III поколений дополнительное

определение чувствительности к цефокситину или цефотетану позволяет дифференцировать продукцию плазмидно-кодируемых  $\beta$ -лактамаз класса C (*AmpC*) и ESBL, относящихся к молекулярному классу A [3].

В отдельных работах показано, что с помощью количественной оценки чувствительности к широкому спектру  $\beta$ -лактаманых антибиотиков (20 и более субстратов) возможна более точная идентификация  $\beta$ -лактамаз, относящихся к одной функциональной группе, например нескольких ESBL-производных TEM и SHV (табл. 4) [59]. Однако метод типирования  $\beta$ -лактамаз, основанный на интерпретации данных определения чувствительности, имеет существенные ограничения.

Во-первых, многие ферменты, отличающиеся структурно, могут вызывать сходные профили антибиотикорезистентности у штаммов-продуцентов. Так, механизмы устойчивости *E. coli* к ингибиторозащищенным пенициллинам, связанные с гиперпродукцией пенициллиназ TEM-1 и TEM-2, продукцией IRT или  $\beta$ -лактамаз OXA-типа, невозможно дифференцировать на основании оценки антибиотикограммы [60].

Во-вторых, спектр устойчивости и МПК различных  $\beta$ -лактаманов могут изменяться в зависимости от количества вырабатываемого фермента, что особенно важно учитывать при диагностике ESBL [3]. По данным О. Рапага и соавт., вариабельность МПК  $\beta$ -лактаманых антибиотиков, наблюдаемая у клинических штаммов *K. pneumoniae* с различным уровнем продукции SHV-5, не позволяет рассматривать анализ фенотипов резистентности как эффективный метод эпидемиологического типирования ESBL-продуцирующих штаммов [61].

В-третьих, идентификация невозможна при наличии у штаммов нескольких  $\beta$ -лактамаз или дополнительных механизмов устойчивости, таких,

Таблица 4. **Наборы антибиотиков, позволяющих дифференцировать продукцию различных  $\beta$ -лактамаз у энтеробактерий [59]**

Фермент	Ингибиторозащищенные пенициллины						Цефалоспорины						Другие $\beta$ -лактамы						
	XL	AB	TLC	PTC	CE	CT	TZ	TZL	LO	CB	CR	CZ	PX	FZ	PM	XM	CN	IP	AT
SHV		+		+		+	+	+		+	+	+			+				+
TEM		+	+	+		+	+		+			+	+	+	+	+			+
OXA	+	+	+	+		+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AmpC			+		+	+			+	+	+	+							+

**Примечание.** XL – амоксициллин/клавулановая кислота, AB – ампициллин/сульбактам, TLC – тикарциллин/клавулановая кислота, PTC – пиперациллин/тазобактам, CE – цефалотин, CT – цефотаксим, TZ – цефтазидим, TZL – цефтазидим/клавулановая кислота, LO – лоракарбеф, CB – цефтибутен, CR – цефпиром, CZ – цефтриаксим, PX – цефподоксим, FZ – цефодизим, PM – цефепим, XM – цефуроксим, CN – цефотетан, IP – имипенем, AT – азтреонам. (+) – отличительный субстрат.

как снижение проницаемости наружной мембраны [3]. В связи с этим следует отметить, что экспрессия множественных факторов устойчивости к  $\beta$ -лактамам антибиотикам становится все более распространенной, особенно среди госпитальных штаммов энтеробактерий [2, 41, 57].

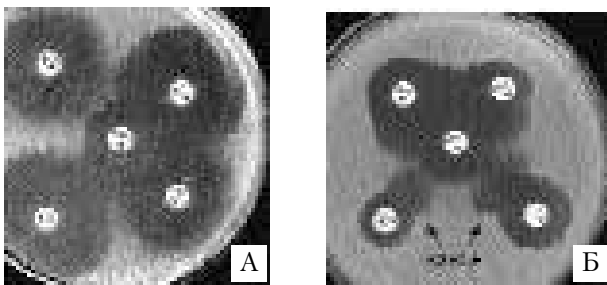
#### 4.1.3. Скрининговые методы выявления ESBL

Наиболее сложной является интерпретация результатов определения чувствительности ESBL-продуцирующих штаммов. Поскольку при тестировании таких штаммов значения МПК цефалоспоринов III–IV поколений не всегда достигают уровня резистентности (8–16 мкг/мл), возникает необходимость использования специальных методов диагностики ESBL [3]. Применяемые с этой целью фенотипические тесты основаны на эффекте подавления активности ESBL в отношении оксимино- $\beta$ -лактамов в присутствии клавулановой кислоты.

Метод «двойных дисков» представляет вариант классического дискодиффузионного метода определения чувствительности, который позволяет обнаружить продукцию ESBL по наличию расширенной зоны подавления роста вокруг диска с цефалоспорином III поколения, например цефтазидимом, расположенного на расстоянии 20–30 мм от диска, содержащего клавулановую кислоту, обычно в виде комбинации амоксициллин/клавуланат (рис. 3).

Известные модификации данного метода, повышающие эффективность детектирования ESBL, включают использование дисков с различными оксимино- $\beta$ -лактамами, а также их размещение на разном удалении от диска, содержащего ингибитор [12].

Прямое сравнение уровней устойчивости к цефалоспоринам расширенного спектра и их комбинациям с клавулановой кислотой, используемое в ряде коммерчески доступных диагностических сис-



**Рис. 3.** Использование метода «двойных дисков» для выявления продукции ESBL: А – отрицательный результат, Б – положительный результат. Обозначения дисков: AMC – амоксициллин/клавулановая кислота (20/10 мкг), CAZ – цефтазидим (30 мкг), CTX – цефотаксим (30 мкг)

тем, обеспечивает более объективную оценку продукции ESBL.

В частности, критерием идентификации ESBL с помощью Е-тестов (AB Biodisk, Швеция) является снижение МПК цефтазидима в 4 и более раз в присутствии клавулановой кислоты (2 мкг/мл) [62], а при использовании дисков, содержащих комбинации цефподоксима (10/1 мкг; Oxoid Ltd, Великобритания), цефтазидима и цефотаксима с клавулановой кислотой (30/10 мкг; MAST Ltd, Великобритания), – увеличение зоны подавления роста не менее чем на 6 мм [63], или в 1,5 раза [64] по сравнению с дисками, содержащими аналогичные субстраты без ингибитора.

Использование нескольких цефалоспоринов в качестве индикаторных субстратов, как правило, повышает эффективность выявления ESBL [12]. Цефтазидим может быть предпочтительным субстратом при тестировании *K. oxytoca*, поскольку в отличие от цефотаксима, цефтриаксона и азтреонама сохраняет активность в отношении штаммов, гиперпродуцирующих хромосомную  $\beta$ -лактамазу K1 [3], а при исследовании штаммов *Enterobacter*, *Citrobacter* и *Serratia* spp. с конститутивной экспрессией *ampC* наиболее чувствительными индикаторами продукции ESBL являются цефалоспорины IV поколения – цефепим и цефпиром [3].

#### 4.1.4. Изоэлектрическое фокусирование (ИЭФ)

Использование ИЭФ для исследования  $\beta$ -лактамаз впервые описано А. Matthew и соавт. в 1975 г. [65]. Данный метод был первоначально использован для дифференциации хромосомных и плазмидно-кодируемых  $\beta$ -лактамаз грамотрицательных бактерий. Впоследствии он позволил идентифицировать множество ферментов, отличающихся значениями изоэлектрических точек.

Как правило, анализ  $\beta$ -лактамаз с помощью ИЭФ не требует их тонкой очистки, поскольку после электрофоретического разделения специфическая гидролитическая активность  $\beta$ -лактамаз может быть выявлена путем окрашивания гелей нитроцефином или другим хромогенным субстратом [65]. Модификации методов детектирования  $\beta$ -лактамазной активности в геле, в частности использование селективных ингибиторов (клавулановой кислоты, ЭДТА), позволяют установить не только значения изоэлектрических точек, но и принадлежность  $\beta$ -лактамаз к определенной функциональной группе [58].

Для выделения  $\beta$ -лактамаз перед ИЭФ обычно применяются такие быстрые методы, как разрушение наружной клеточной мембраны с помощью ультразвука, высокого давления, последовательно-

го замораживания–оттаивания, осмотического шока или хлороформной экстракции, с последующим центрифугированием для удаления разрушенных клеток [66].

При использовании готовых полиакриламидных гелей, содержащих амфолиты, определение изоэлектрических точек может быть проведено в течение нескольких часов [67]. Скорость анализа в сочетании с возможностью одновременного тестирования значительного количества штаммов позволяет использовать метод ИЭФ для исследования эпидемиологии  $\beta$ -лактамаз [58].

До середины 80-х годов прошлого века число известных плазмидных  $\beta$ -лактамаз не превышало 20. Все они могли быть дифференцированы с помощью ИЭФ [68]. В настоящее время только группы TEM и SHV ферментов насчитывают более 100 производных, многие из которых обладают идентичными значениями изоэлектрических точек (табл. 2, 3). Например, значения рI 5,4, 5,6 и 7,6, характерные для  $\beta$ -лактамаз TEM-1, TEM-2 и SHV-1, также соответствуют более 30 различным ESBL и IRT производным.

Кроме того, диапазоны рI TEM, OXA и SHV ферментов частично перекрываются, что в ряде случаев обуславливает невозможность их дифференциации на основании одних только данных изофокусирования.

#### 4.1.5. Исследование ферментативной кинетики

Два типа исследований наиболее широко используются для определения кинетических параметров  $\beta$ -лактамаз: спектрофотометрия и рН-статическое титрование [12, 58].

Метод автоматического рН-титрования основан на измерении скорости добавления щелочного раствора, необходимого для поддержания стабильности рН в процессе ферментативного расщепления  $\beta$ -лактаманного субстрата. Данный метод более трудоемкий и требует большего расхода субстратов и исследуемого фермента, чем при спектрофотометрическом анализе.

Кроме того, при использовании рН-титрования определение скорости расщепления цефалоспоринов, образующих множественные заряженные продукты гидролиза, или цвиттерионных  $\beta$ -лактамов (ампициллина, имипенема, цефалоридина), растворы которых обладают буферной емкостью, может быть недостаточно точным [12].

Поскольку расщепление  $\beta$ -лактаманых антибиотиков в растворе обычно сопровождается снижением его оптической плотности в ультрафиолетовом диапазоне, спектрофотометрия обеспечивает наиболее удобный способ определения активности

$\beta$ -лактамаз [58]. Быстрое сравнение ферментов можно провести путем определения относительной скорости гидролиза различных  $\beta$ -лактамов. Необходимыми условиями для этого являются:

- 1) использование насыщающей концентрации субстрата ( $[S] \gg K_m$ ), при которой скорость гидролиза приближается к максимальной ( $V_{max}$ );
- 2) оценка начальной (наиболее быстрой) фазы реакции [12].

Точные значения  $V_{max}$  и константы Михаэлиса ( $K_m$ ) могут быть получены только путем измерения скорости гидролиза не менее чем при 10 различных концентрациях каждого антибиотика ( $0,2 K_m \leq [S] \leq 10 K_m$ ) или с помощью анализа полной кинетической кривой расщепления субстрата, начальная концентрация которого в 2,5–5 раз превышает  $K_m$  [58].

Исследование ферментативной кинетики позволяет выявить важнейшие функциональные особенности  $\beta$ -лактамаз. Оно является обязательным для описания новых ферментов и изучения их роли в формировании резистентности. Однако в связи с высокой трудоемкостью и высокой вероятностью погрешности измерений и расчета кинетических констант данный метод неприменим для типирования большого количества ферментов [58, 68, 69].

## 4.2. Генотипические методы

В последнее время развитие молекулярно-генетических методов, включая методы молекулярной гибридизации, *in vitro* амплификации нуклеиновых кислот с помощью полимеразной цепной реакции (ПЦР) и определения нуклеотидной последовательности генов (*секвенирования*), сделало возможным их широкомасштабное использование в клинической лабораторной диагностике.

В области клинической микробиологии основой создания и внедрения в практику новых молекулярно-диагностических методов являются фундаментальные исследования генетической организации патогенных микроорганизмов. Благодаря накоплению и систематическому анализу информации о первичной структуре генов микроорганизмов стала возможной не только прямая генетическая идентификация (*генодиагностика*) возбудителей инфекционных болезней, но и исследование их наиболее важных свойств, таких, как вирулентность, токсигенность и чувствительность к антимикробным препаратам [70, 71].

### 4.2.1. Секвенирование генов $\beta$ -лактамаз

Применительно к исследованию  $\beta$ -лактамаз определение кодирующих нуклеотидных последовательностей и сравнение их с последовательностями известных генов являются необходимыми про-

цедурами для описания новых ферментов [68]. Кроме того, вследствие недостаточной дифференцирующей способности фенотипических методов ДНК-секвенирование общепризнанно считается наиболее точным и надежным методом типирования известных  $\beta$ -лактамаз, включая различные производные плазмидных  $\beta$ -лактамаз TEM и SHV типов у клинических штаммов микроорганизмов [72].

В то же время определение полной нуклеотидной последовательности гена является трудоемким и дорогостоящим методом. Традиционные методы секвенирования включают предварительные этапы выделения и клонирования исследуемых фрагментов ДНК. При наличии информации о характере нуклеотидных последовательностей, фланкирующих исследуемый участок ДНК, в последнее время чаще применяется метод прямой амплификации и секвенирования соответствующих генов, который позволяет избежать необходимости их клонирования.

Использование автоматических систем секвенирования с возможностью детектирования нерадиоактивной метки позволяет дополнительно снизить трудоемкость и повысить безопасность анализа. При сравнении различных методов определения нуклеотидной последовательности генов SHV  $\beta$ -лактамаз показано, что автоматическое секвенирование с использованием флуоресцентно меченных дидезокситерминаторов (ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit; Applied Biosystems, США) предпочтительнее по сравнению с традиционными методами, так как позволяет избежать ошибок, связанных с высокой Г+Ц насыщенностью  $bla_{SHV}$  генов ( $\approx 61\%$ ) относительно генов других плазмидных  $\beta$ -лактамаз (содержание Г+Ц: 49, 41 и 50% для  $bla_{TEM-1}$ ,  $bla_{PSE-1}$  и  $bla_{OXA-1}$  соответственно) [73].

Вследствие значительной протяженности генов  $\beta$ -лактамаз (>1000 пн) определение их полной нуклеотидной последовательности обычно требует проведения нескольких реакций секвенирования с использованием праймеров, комплементарных внутренним участкам гена, что увеличивает стоимость и трудоемкость анализа.

Таким образом, метод ДНК-секвенирования в настоящее время не может быть использован для анализа  $\beta$ -лактамаз у большого количества клинических штаммов, например, при эпидемиологических исследованиях [69].

#### 4.2.2. ДНК-гибридизация

Гибридизация с ДНК-зондами, которые представляют протяженные (>200 пн) участки  $\beta$ -лактамазных генов, может быть использована для выяв-

ления ферментов определенной генетической группы, например TEM, SHV-OHIO-LEN, OXA, PSE [68].

В случае плазмидной локализации генов  $\beta$ -лактамаз и при наличии данных рестрикционного картирования ДНК-зонды могут быть получены путем выделения соответствующих рестрикционных фрагментов. В последнее время для получения гибридных зондов чаще применяется ПЦР с праймерами, комплементарными внутренним фрагментам генов  $\beta$ -лактамаз.

Недостатком использования полинуклеотидных зондов является их способность к кросс-гибридизации с генами различных  $\beta$ -лактамаз, принадлежащих к одной генетической группе, и невозможность типирования с их помощью различных производных, отличающихся по спектру мутаций.

Использование олигонуклеотидных зондов для дифференциации близкородственных  $\beta$ -лактамаз TEM-1 и TEM-2 впервые описали в 1987 г. M. Ouellette и соавт. [74]. В 1990 г. С. Mabilat и P. Courvalin предложили использование синтетических гептадекануклеотидных фрагментов, комплементарных участкам  $bla_{TEM}$  генов с известными позициями нуклеотидных замен, для типирования TEM  $\beta$ -лактамаз у клинических штаммов энтеробактерий методом блот-гибридизации колоний [75].

Дизайн первоначально предложенных 12 олигонуклеотидных зондов был основан на данных структуры 5 участков, мутации в которых обуславливают различия между пенициллиназами TEM-1 и TEM-2, а также первых 5 производных TEM с расширенным спектром активности TEM-3, TEM-4, TEM-5, TEM-6 и TEM-7. Скрининг коллекции из 256 ESBL-продуцирующих клинических штаммов энтеробактерий с помощью предложенных олигонуклеотидных зондов позволил выявить не только ранее описанные ферменты, но и ряд производных с альтернативными комбинациями известных аминокислотных замен TEM-13, TEM-14 и TEM-19. Для типирования ESBL были также успешно использованы нерадиоактивные (биотинилированные) зонды [76].

Впоследствии были разработаны олигонуклеотидные зонды для типирования ингибиторорезистентных производных TEM, отличающихся заменами аминокислот в позициях 69 (TEM-32, -33, -34, -35, -37, -38, -39), 244 (TEM-30, -31) и 276 (TEM-35, -36, -37, 39) [77]. Для их идентификации у клинических штаммов *E. coli* были использовано 15 зондов с различными вариантами нуклеотидных замен, соответствующих 3 позициям в полипептидной цепи TEM.

Благодаря высокой точности и производитель-



ности метод гибридизации с олигонуклеотидными зондами (олиготипирования) широко используется для изучения распространенности ТЕМ  $\beta$ -лактамаз с определенным спектром мутаций. Однако по мере увеличения количества описываемых ТЕМ-производных и обнаружения новых мутаций в генах, кодирующих ферменты этой группы, дефинитивное определение  $\beta$ -лактамаз с помощью олиготипирования становится технически все более затруднительным из-за необходимости использования большого количества зондов.

В частности, уже сейчас в генах  $bla_{\text{ТЕМ}}$  описано более 30 нуклеотидных замен, приводящих к заменам аминокислот, и приблизительно равное количество молчащих мутаций. С учетом их взаимного расположения анализ всех «функциональных» мутаций с помощью олиготипирования в формате блот-гибридизации становится практически невозможным.

Вероятно, в будущем разработка методов микрогибридизации в формате ДНК-чипов, допускающих использование сотен и тысяч олигонуклеотидных зондов, позволит решить проблему типирования  $\beta$ -лактамаз данной группы.

#### 4.2.3. Использование ПЦР для исследования $\beta$ -лактамаз

ПЦР является одним из наиболее практически значимых молекулярно-диагностических методов, который широко используется для выявления и исследования различных детерминант устойчивости к антибиотикам у клинических штаммов микроорганизмов, включая гены  $\beta$ -лактамаз [71].

В качестве самостоятельного диагностического метода ПЦР, как и гибридизация, может быть использована для выявления известных  $\beta$ -лактамаз, относящихся к определенной генетической группе. Благодаря преимуществу в чувствительности ПЦР в некоторых случаях позволяет установить наличие микроорганизмов, продуцирующих  $\beta$ -лактамазы, непосредственно в клинических образцах без предварительного культивирования.

Так, например, F. Tenover и соавт. описали использование ПЦР с праймерами, специфичными для генов ТЕМ и ROV  $\beta$ -лактамаз, для прямого обнаружения штаммов *H. influenzae*, резистентных к ампициллину, в образцах спинномозговой жидкости [78]. При этом выявлена почти 100% корреляционная связь между выявлением  $bla_{\text{ТЕМ}}$  генов, результатами определения чувствительности выделенных штаммов *H. influenzae* к ампициллину и детектирования продукции  $\beta$ -лактамаз с помощью нитроцефина.

Аналогичный метод ПЦР разработали

J.-L. Simard и P. Roy для выявления продукции пенициллиназы ТЕМ-1 у штаммов *N. gonorrhoeae* [79].

Для большинства видов семейства *Enterobacteriaceae* положительный или отрицательный результат амплификации не имеет такого диагностического значения, как для *H. influenzae* и *N. gonorrhoeae*, в связи с разнообразием продуцируемых энтеробактериями  $\beta$ -лактамаз, различия между которыми в большей степени влияют на характер устойчивости к  $\beta$ -лактамам антибиотикам. Необходимость дифференциации генов  $\beta$ -лактамаз, отличающихся спектром мутаций, требует привлечения дополнительных методов анализа соответствующих ПЦР-продуктов [80].

Известные методы быстрого выявления точечных мутаций в фрагментах ДНК, амплифицированных с помощью ПЦР, можно условно разделить на *четыре* основные группы:

1) методы селективного расщепления рестриционными эндонуклеазами, например, анализ *полиморфизма длины рестриционных фрагментов* (ПДРФ);

2) методы анализа конформационных изменений ДНК, связанных с появлением мутаций, включая наиболее часто используемый метод *одноцепочечного конформационного полиморфизма* (SSCP);

3) методы гибридизации с внутренними олигонуклеотидными зондами или амплификации с праймерами, комплементарными участкам мутаций;

4) методы химического или ферментативного расщепления гетеродуплексов в участках неспаренных оснований [80].

До настоящего времени только 3 метода были использованы для исследования  $\beta$ -лактамаз: ПДРФ, SSCP и *лигазная цепная реакция* (ЛЦР).

#### 4.2.4. Полиморфизм длины рестриционных фрагментов (ПДРФ)

Метод ПДРФ основан на способности рестриционных эндонуклеаз расщеплять двухцепочечную ДНК в участках с определенной нуклеотидной последовательностью – *сайтах рестрикции*. Благодаря этому любые изменения первичной структуры генов, связанные с исчезновением или появлением нового сайта рестрикции, могут быть обнаружены путем амплификации, расщепления с помощью соответствующих рестриктаз и электрофоретического разделения полученных фрагментов ДНК (рис. 4).

Как один из наиболее доступных методов, ПЦР–ПДРФ-анализ был использован для выявления мутаций, приводящих к развитию устойчивости к различным препаратам у многих видов микроорганизмов: ванкомицину (*vanC*) у *Enterococcus*



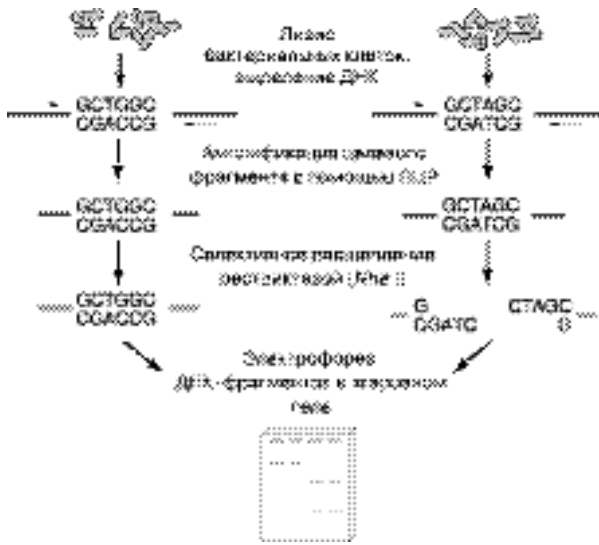


Рис. 4. Алгоритм ПЦР–ПДРФ-анализа

spp., изониазиду (*katG*) и стрептомицину (*rrs*) у *M. tuberculosis*, фторхинолонам (*gyrA*) у *E. coli* и  $\beta$ -лактамам (*bla*<sub>TEM</sub> и *bla*<sub>SHV</sub>) у *E. coli*, *K. pneumoniae* и других энтеробактерий [70].

Применение ПЦР–ПДРФ для анализа генов TEM  $\beta$ -лактамаз впервые описали G. Arlet и соавт. в 1995 г. [81]. Этот метод позволил охарактеризовать отдельные мутации в генах 10 контрольных TEM ферментов и исследовать на генетическом уровне различия между  $\beta$ -лактамазами расширенного спектра TEM-20, TEM-21 и TEM-29, которые были выявлены у клинических штаммов *K. pneumoniae* и предварительно описаны только с использованием биохимических тестов.

Однако следует отметить, что секвенирование *bla*<sub>TEM-20</sub>, *bla*<sub>TEM-21</sub> и *bla*<sub>TEM-29</sub>, проведенное той же группой авторов в 1999 г., позволило внести дополнительные изменения и уточнения в структуру соответствующих ферментов, предсказанную на основании данных ПДРФ [82].

M. Sanica и соавт. исследовали с помощью ПЦР–ПДРФ и секвенирования гены ингибиторорезистентных TEM  $\beta$ -лактамаз у 27 клинических штаммов *E. coli* и на основании спектра выявленных мутаций показали возможность конвергентной эволюции IRT от двух различных генетических линий, представленных рестрикционными группами *bla*<sub>TEM-1b</sub> и *bla*<sub>TEM-2</sub> производных [83].

В 1996 г. M.T. Nuesch-Inderbinen и соавт. предложили метод обнаружения ESBL SHV-типа, основанный на ПЦР-амплификации *bla*<sub>SHV</sub> генов и их селективном расщеплении рестриктазой *Nhe* I, так называемый ПЦР/*Nhe* I тест [84].

Расширенный спектр ферментативной активно-

сти у производных SHV-1 обычно связан с заменой Гли<sub>238</sub>→Сер [29]. В свою очередь, эта аминокислотная замена является следствием Г→А транзиции в кодирующей нуклеотидной последовательности и сопровождается формированием уникального сайта рестрикции *Nhe* I (ГCTAGC). Положительный результат расщепления *bla*<sub>SHV</sub> ампликона с помощью *Nhe* I свидетельствует, таким образом, о наличии ESBL.

ПЦР/*Nhe* I тест был использован для анализа контрольных штаммов, продуцирующих  $\beta$ -лактамазы SHV-1, SHV-2, SHV-2a, SHV-3, SHV-5 и SHV-7, а также 34 клинических штаммов *K. pneumoniae*, *E. coli*, *E. cloacae* и *S. enterica*, ДНК которых гибридизовалась с внутренним зондом *bla*<sub>SHV</sub>. При этом специфичность детектирования ESBL составила 100%, а чувствительность – 97%. В то же время чувствительность стандартного метода E-тестов, с которым проводилось сравнение, с учетом современных критериев интерпретации оказалась менее 65%.

Необходимо отметить, что некоторые недавно описанные ESBL, включая SHV-6, SHV-8 и SHV-11, не могут быть обнаружены с помощью ПЦР/*Nhe* I теста, поскольку гены этих ферментов отличаются мутациями в других кодонах и не содержат сайт рестрикции *Nhe* I. Кроме того, исследования по сайтонаправленному мутагенезу SHV  $\beta$ -лактамаз в позиции 238 показывают, что замены глицина не только серином, но и другими аминокислотами, не связанные с образованием сайта *Nhe* I в нуклеотидной последовательности, также могут вызывать резистентность к цефотаксиму и цефтазидиму [85].

В целом узкий спектр детектируемых мутаций является наиболее существенным ограничением для использования метода ПЦР–ПДРФ применительно к исследованию  $\beta$ -лактамаз.

#### 4.2.5. Одноцепочечный конформационный полиморфизм (SSCP)

Метод SSCP впервые описали M. Orita и соавт. в 1989 г. для обнаружения мутаций в генах человека [86]. Впоследствии метод использован для диагностики наследственных и соматических генетических болезней. В настоящее время ПЦР–SSCP-анализ также широко применяется в клинической молекулярной микробиологии. Список известных приложений этого метода включает видовое и субвидовое типирование патогенных микроорганизмов [87], выявление мутаций в различных генах, связанных с формированием антибиотикорезистентности, например *katG*, *inhA*, *ahpC*, *rpoB*, *embB*, *gyrA* у *M. tuberculosis* [70], *bla*<sub>TEM</sub> и *bla*<sub>SHV</sub> у энтеробактерий [60, 69].

Метод SSCP основан на эффекте влияния то-

чных мутаций на электрофоретическую подвижность коротких (100–450 нуклеотидов) одноцепочечных фрагментов ДНК (оцДНК) при их разделении в нативных условиях. В ходе SSCP-анализа фрагменты ДНК, полученные в результате ПЦР, подвергаются температурной денатурации (плавлению) и быстрому охлаждению с целью стабилизации разделенных цепей ДНК. Каждая из цепей приобретает определенную конформацию, которая зависит от формирования внутренних участков комплементарности и, следовательно, от взаимного расположения нуклеотидов в цепи.

Полученные оцДНК конформеры разделяются с помощью неденатурирующего электрофореза в высокоразрешающем полиакриламидном геле при пониженной температуре (4–20°C), обеспечивающей устойчивость их пространственной структуры. Единичные нуклеотидные замены приводят к заметному изменению подвижности исследуемой ДНК по сравнению с контрольной (рис. 5).

V. Speldooren и соавт. впервые применили метод ПЦР–SSCP для исследования генов IRT [60]. В связи с необходимостью анализа полной нуклеотидной последовательности *bla*<sub>TEM</sub> (≈1000 пн), три пары праймеров были использованы для амплификации частично перекрывающихся фрагментов ДНК, соответствующих промоторной (388 пн) и структурной частям гена (426 и 418 пн). SSCP-анализ этих фрагментов позволил дифференцировать гены с известной нуклеотидной последовательностью *bla*<sub>TEM-1a, -1b, -2, -30, -32, -35</sub> и выявить новые мутации в генах *bla*<sub>TEM-33, -34, -36, -37, -38, -39</sub>, предварительно идентифицированных с помощью олиготипирования.

При исследовании 8 клинических штаммов

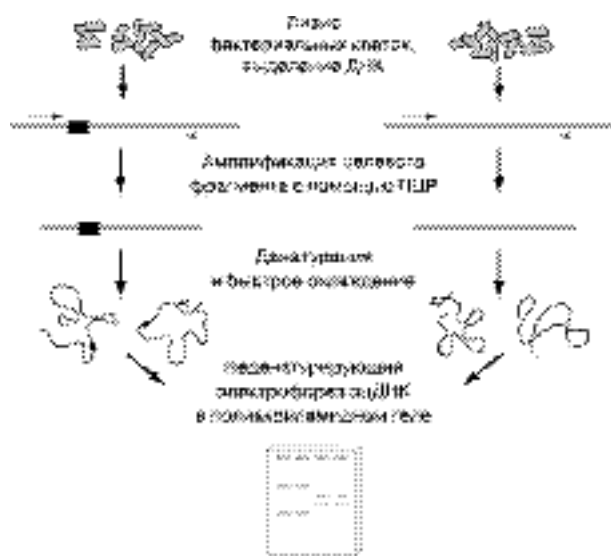


Рис. 5. Алгоритм ПЦР–SSCP-анализа

*E. coli*, выделенных в одном стационаре и отличающихся резистентностью к ингибиторозащищенным пенициллинам, данный метод позволил установить гиперпродукцию пенициллиназы TEM-1 у 3 штаммов, а также наличие известных β-лактамаз TEM-30, TEM-32, TEM-35 и нового фермента TEM-58 с уникальной комбинацией аминокислотных замен (Arg<sub>244</sub>→Сер и Val<sub>261</sub>→Иле) у 4 других штаммов.

Одновременно с разработкой метода ПЦР–SSCP для исследования IRT β-лактамаз в 1995–1998 гг. была показана возможность использования этого подхода для генетического типирования отдельных ферментов группы SHV [69, 88].

Метод SSCP, предложенный F.H. M'Zali и соавт. для дифференциации SHV-производных, предполагает анализ отдельного участка *bla*<sub>SHV</sub> гена длиной 475 пн, который включает позиции наиболее частых нуклеотидных замен. Соответствующий этому участку ПЦР-продукт подвергается расщеплению рестриктазой *Pst* I на 2 фрагмента (300 и 175 пн), которые затем анализируются с помощью SSCP-электрофореза и окрашивания серебром.

Несмотря на ограничения, связанные с невозможностью оценки полной нуклеотидной последовательности гена, данный вариант SSCP успешно использован для дифференциации β-лактамаз SHV-1, SHV-2, SHV-3, SHV-4, SHV-5 и SHV-7 у контрольных штаммов [69, 88], а также у большого числа госпитальных ESBL-продуцирующих штаммов *K. pneumoniae*, выделенных в различных медицинских центрах [40]. При этом для выборочно исследованных культур было показано наличие корреляции между результатами SSCP-типирования и определения нуклеотидной последовательности амплифицируемого фрагмента *bla*<sub>SHV</sub>.

Тем не менее многие ферменты, например SHV-1, SHV-2a и SHV-11, а также SHV-6 и SHV-12, не могут быть дифференцированы с использованием данного подхода, поскольку мутация Лей<sub>35</sub>→Глн, определяющая различия между ними, находится за пределами амплифицируемого фрагмента ДНК. Для решения этой проблемы авторы предложили параллельное использование методов ПЦР–SSCP и ПЦР–ПДФ, последний из которых предполагает амплификацию более широкого участка *bla*<sub>SHV</sub> гена и его расщепление рестриктазой *Dde* I [89].

Задача скрининга мутаций в полной нуклеотидной последовательности генов TEM и SHV β-лактамаз может быть также решена путем последовательной рестрикции протяженных ПЦР-продуктов и SSCP-анализа полученных рестрикционных фрагментов ДНК. Основным преимуществом данного подхода, известного как REF–SSCP (одноцепочечный конформационный полиморфизм рестрик-

ционных фрагментов), является его высокая производительность в сочетании с возможностью выявления широкого спектра известных и неизвестных точечных мутаций.

Метод REF–SSCP успешно использован нами для дифференциации многочисленных вариантов TEM и SHV  $\beta$ -лактамаз. В частности, нерадиоактивный SSCP-анализ *Taq* I–*Pst* I-рестрикционных фрагментов *bla*<sub>TEM</sub> генов позволил выявить спектр мутаций, определяющих различия между пенициллиназами TEM-1, TEM-2 и их производными с расширенным спектром активности TEM-3, TEM-4, TEM-7, TEM-9, TEM-12, TEM-26, а применение альтернативной комбинации рестриктаз *Taq* I–*Ava* II – обнаружить мутации, характерные для IRT-производных TEM-32, TEM-37, TEM-39 [90].

Аналогичный подход с использованием рестриктаз *Bsa*O I–*Nhe* I предложен для дифференциации ферментов SHV-группы SHV-1, SHV-2, SHV-3, SHV-4, SHV-5 и SHV-6 [91].

Необходимо отметить, что при наличии оборудования, обеспечивающего высокую стандартизацию условий SSCP-анализа, данный подход может быть использован как один из наиболее эффективных методов исследования эпидемиологии TEM и SHV  $\beta$ -лактамаз. Однако наиболее существенным его недостатком является невозможность определения характера выявленных мутаций, а следовательно, точного типирования ферментов.

#### 4.2.6. Лигазная цепная реакция (ЛЦР)

ЛЦР представляет собой метод многократного последовательного лигирования олигонуклеотидных праймеров, комплементарных исследуемой последовательности ДНК, осуществляемый термостабильной лигазой.

В каждой реакции ЛЦР используются две взаимокплементарные пары праймеров. При условии строгого соответствия целевой последовательности ДНК праймеры каждой пары связываются с одной из ее цепей таким образом, что 5'-конец одного праймера располагается непосредственно вслед за 3'-концом другого, создавая возможность их кова-

лентного связывания с помощью ДНК-лигазы. В последующих циклах ЛЦР связавшиеся олигонуклеотиды могут служить матрицей для отжига и лигирования праймеров комплементарной пары.

Таким образом, реакция носит циклический характер и может быть использована для чувствительного обнаружения точечных мутаций в участках связывания праймеров [70].

Использование ЛЦР для детектирования мутаций в генах SHV  $\beta$ -лактамаз, предварительно амплифицированных с помощью ПЦР, предложили J. Kim и Y. Kwon в 1999 г. [92]. Они показали возможность дифференциации генов 7 контрольных  $\beta$ -лактамаз (SHV-1, SHV-2, SHV-2a, SHV-3, SHV-4, SHV-5 и SHV-12) с помощью 4 наборов ЛЦР-праймеров (16 олигонуклеотидов), соответствующих участкам мутаций Лей<sub>35</sub>→Глн, Арг<sub>205</sub>→Лей, Гли<sub>238</sub>→Сер и Глу<sub>240</sub>→Лиз.

### 5. Заключение

Многообразие  $\beta$ -лактамаз, их широкое распространение среди грамотрицательных бактериальных возбудителей инфекций и одновременно ведущая роль в формировании устойчивости к  $\beta$ -лактамам антибиотикам диктуют необходимость всестороннего изучения и внедрения в широкую практику надежных и максимально стандартизованных методов их диагностики. В частности, важное практическое значение имеет использование клинико-диагностическими лабораториями чувствительных хромогенных тестов для выявления продукции  $\beta$ -лактамаз у *H. influenzae* и *N. gonorrhoeae*, а также фенотипическое определение ESBL у госпитальных штаммов энтеробактерий.

Вместе с тем изучение разнообразия, свойств и эпидемиологии  $\beta$ -лактамаз является важной задачей специализированных референтных лабораторий, исследующих механизмы устойчивости к  $\beta$ -лактамам. Успех в решении этой задачи в значительной степени определяется возможностью комплексного использования современных фенотипических и молекулярно-генетических методов исследования.

### Л и т е р а т у р а

1. Webb E. C., editor. Enzyme nomenclature. London: Academic Press Inc. (London) Ltd.; 1984. p. 366-74.
2. Bush K. The evolution of  $\beta$ -lactamases. Antibiotic Resistance: Origins, Evolution, Selection and Spread. John Wiley & Sons; 1997. p. 152-69.
3. Livermore D.M.  $\beta$ -Lactamases in laboratory and clinical resistance. Clin Microb Reviews 1995; 8: 557-84.
4. Bush K., Jacoby G., Medeiros A. Functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:1211-33.
5. Rasmussen B.A., Bush K. Carbapenem-hydrolyzing  $\beta$ -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:223-32.
6. Abraham E.P., Chain E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. Nature 1940; 373:837.
7. Fleming P.C., Goldner M., Glass D.G. Observations on the nature, distribution, and significance of cephalospori-

- nase. *Lancet* 1963; I:1399-401.
8. Richmond M.H., Sykes R.B. The  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria and their possible physiological role. *Adv Microb Physiol* 1973; 9:31-88.
  9. Sykes R.B., Matthew M. The  $\beta$ -lactamases of gram-negative bacteria and their role in resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *J Antimicrob Chemother* 1976; 2:115-57.
  10. Mitsuhashi S., Inoue M. Mechanisms of resistance to beta-lactam antibiotics. In: Mitsuhashi S., editors. *Beta-lactam antibiotics*. New York: Springer-Verlag; 1981. p. 41-56.
  11. Ambler R.P. The structure of  $\beta$ -lactamases. *Philos Trans R Soc Lond (Biol.)* 1980; 289:321-31.
  12. Livermore D.M., Williams J.D.  $\beta$ -Lactams: mode of action and mechanisms of bacterial resistance. In: Lorian V., editor. *Antibiotics in laboratory medicine*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1991. p. 503-78.
  13. Livermore D.M. Mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics. *Scand J Infect Dis* 1991; 78 (Suppl.):7-16.
  14. Matagne A., Lamotte-Brasseur J., Frere J.M. Catalytic properties of class A  $\beta$ -lactamases: efficiency and diversity. *Biochem J* 1998; 1:581-98.
  15. Tzouveleki L.S., Tzelepi E., Tassios P.T., Legakis N.J. CTX-M-type  $\beta$ -lactamases: an emerging group of extended-spectrum enzymes. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 14:137-42.
  16. Bonomo R.A., Rice L.B. Inhibitor resistant class A beta-lactamases. *Frontiers Bioscience* 1999; 4:34-41.
  17. Nicolas-Chanoine M.H. Inhibitor-resistant  $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1997; 40:1-3.
  18. Prinarakis E.E., Miriagou V., Tzelepi N., Gazouli M., Tzouveleki L.S. Emergence of an inhibitor-resistant  $\beta$ -lactamase (SHV-10) derived from an SHV-5 variant. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:838-40.
  19. Huovinen S., Huovinen P., Jacoby G.A. Detection of plasmid-mediated  $\beta$ -lactamases with DNA probes. *Antimicrob Agents Chemother* 1988; 32:175-9.
  20. Roy C., Segura C., Tirado M., Reig R., Hermida M., Tervel D., et al. Frequency of plasmid determined beta-lactamases in 680 consecutively isolated strains of *Enterobacteriaceae*. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1986; 4:146-7.
  21. Simpson I.N., Harper P.B., O'Callaghan C.H. Principal  $\beta$ -lactamases responsible for resistance to  $\beta$ -lactam antibiotics in urinary tract infections. *Antimicrob Agents Chemother* 1980; 17:929-36.
  22. Du Bois S.K., Marriott M.S., Amyes S.G. TEM- and SHV-derived extended-spectrum  $\beta$ -lactamases: relationship between selection, structure and function. *J Antimicrob Chemother* 1995; 35:7-22.
  23. Wiedemann B., Kliebe C., Kresken M. The epidemiology of  $\beta$ -lactamases. *J Antimicrob Chemother* 1989; 24 (Suppl. B.):1-22.
  24. Chen S.T., Clowes R.S. Variation between the nucleotide sequences of *Tn1*, *Tn2*, and *Tn3* and expression of  $\beta$ -lactamase in *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 1987; 169:913-6.
  25. Goussard S., Courvalin P. Sequences of the genes *blaT-1B* and *blaT-2*. *Gene* 1991; 102:71-3.
  26. Thomson C.J., Amyes S.G. Molecular epidemiology of the plasmid-encoded TEM-1  $\beta$ -lactamase in Scotland. *Epidemiol Infect* 1993; 110:117-25.
  27. Bonnet R., De Champs C., Sirot D., Chanal C., Labia R., Sirot J. Diversity of TEM mutants in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:2671-7.
  28. Palzkill T., Thomson K.S., Sanders C.C., Moland E.S., Huang W., Milligan T.W. New variant of TEM-10  $\beta$ -lactamase gene produced by a clinical isolate of *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:1199-200.
  29. Heritage J., M'Zali F.H., Gascoyne-Binzi D., Hawkey P.M. Evolution and spread of SHV extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in gram-negative bacteria. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44:309-18.
  30. Huletsky A., Couture F., Levesque R.C. Nucleotide sequence and phylogeny of SHV-2  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:1725-32.
  31. Knox J.R. Extended-spectrum and inhibitor-resistant TEM-type  $\beta$ -lactamases: mutations, specificity, and three-dimensional structure. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:2593-601.
  32. Kuzin A.P., Nukaga M., Nukaga Y., Hujer A.M., Bonomo R.A., Knox J.R. Structure of the SHV-1  $\beta$ -lactamase. *Biochemistry* 1999; 4:5720-7.
  33. Siu L.K., Ho P.L., Yuen K.Y., Wong S.S., Chau P.Y. Transferable hyperproduction of TEM-1  $\beta$ -lactamase in *Shigella flexneri* due to a point mutation in the pribnow box. *Antimicrob. Agents Chemother* 1997; 41:468-70.
  34. Wu P.J., Shannon K., Phillips I. Mechanisms of hyperproduction of TEM-1  $\beta$ -lactamase by clinical isolates of *Escherichia coli*. *J Antimicrob Chemother* 1995; 36:927-39.
  35. Payne D.J., Marriot M.S., Amyes S.G.B. Characterisation of a unique ceftazidime hydrolysing  $\beta$ -lactamase, TEM-E2. *J Med Microbiol* 1990; 32:131-4.
  36. Heritage J., Hawkey P.M., Todd N., Lewis I.J. Transposition of the gene encoding a TEM-12 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase. *Antimicrob Agents Chemother* 1992; 36:1981-6.
  37. Knothe H., Shah P., Kremery V., Antal M., Mitsuhashi S. Transferable resistance to cefotaxime, cefoxitin, cefamandole and cefuroxime in clinical isolates of *Klebsiella pneumoniae* and *Serratia marcescens*. *Infection* 1983; 11:315-7.
  38. Kliebe C., Nies B. A., Meyer J.F., Tolxdorff-Neutzling R.M., Wiedemann B. Evolution of plasmid-coded resistance to broad-spectrum cephalosporins. *Antimicrob Agents Chemother* 1985; 28:302-7.
  39. Jacoby G.A., Medeiros A.A. More extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1991; 35:1697-704.
  40. Yuan M., Aucken H., Hall L.M., Pitt T.L., Livermore D.M. Epidemiological typing of klebsiellae with extended-spectrum  $\beta$ -lactamases from European intensive care units. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41:527-39.
  41. Сидоренко С. В. Механизмы антибиотикорезистентности. В кн: Страчунский Л.С., Белоусов Ю.Б., Козлова С.Н., под ред. Антибактериальная терапия. Практическое руководство. Москва: Фармединфо; 2000. с. 1-6.
  42. Arlet G., Rouveau M., Casin I., Bouvet P. J., Lagrange P. H., Philippon A. Molecular epidemiology of *Klebsiella*



- pneumoniae* strains that produce SHV-4  $\beta$ -lactamase and which were isolated in 14 French hospitals. J Clin Microbiol 1994; 32:2553-8.
43. Hibbert-Rogers L.C., Heritage J., Todd N., Hawkey P.M. Convergent evolution of TEM-26, a  $\beta$ -lactamase with extended-spectrum activity. J Antimicrob Chemother 1994; 33:707-20.
  44. Peixe L.V., Sousa J.C., Perez-Diaz J.C., Baquero F. A bla(TEM-1b)-derived TEM-6  $\beta$ -lactamase: a case of convergent evolution. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:1206.
  45. Jacoby G.A., Sutton L. Properties of plasmids responsible for production of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. Antimicrob Agents Chemother 1991; 35:164-9.
  46. Jacoby G., Bush K. Amino Acid Sequences for TEM, SHV and OXA Extended-Spectrum and Inhibitor Resistant  $\beta$ -Lactamases. [cited 2000 Jul 24] Available from: URL: <http://www.lahey.org/studies/webt.htm>.
  47. Ambler R.P. A standard numbering scheme for the class A  $\beta$ -lactamases. Biochem J 1991; 276:269-72.
  48. Brun-Buisson C., Legrand P., Philippon A., Montravers S., Ansquer M., Duval J. Transferable enzymatic resistance to third-generation cephalosporins during nosocomial outbreak of multiresistant *Klebsiella pneumoniae*. Lancet 1987; II:302-6.
  49. Thomson C.J., Shanahan P.M., Amyes S.G. Nucleotide sequences of inhibitor-resistant TEM  $\beta$ -lactamases. J Antimicrob Chemother 1998; 41:572-3.
  50. Chaibi E.B., Sirot D., Paul G., Labia R. Inhibitor-resistant TEM  $\beta$ -lactamases: phenotypic, genetic and biochemical characteristic. J Antimicrob Chemother 1999; 43:447-58.
  51. Henquell C., Sirot D., Chanal C., De Champs C., Chatron P., Lafeuille B., Texier P., Sirot J., Cluzel R. Frequency of inhibitor-resistant TEM  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* isolates from urinary tract infections in France. J Antimicrob Chemother 1994; 34:707-14.
  52. Bret L., Chanal C., Sirot D., Labia R., Sirot J. Characterization of an inhibitor-resistant enzyme IRT-2 derived from TEM-2  $\beta$ -lactamase produced by *Proteus mirabilis* strains. J Antimicrob Chemother 1996; 38:183-91.
  53. Bermudes H., Jude F., Chaibi E.B., Arpin C., Bebear C., Labia R., Quentin C. Molecular characterization of TEM-59 (IRT-17), a novel inhibitor-resistant TEM-derived  $\beta$ -lactamase in a clinical isolate of *Klebsiella oxytoca*. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:1657-61.
  54. Lemozy J., Sirot D., Chanal C., Huc C., Labia R., Dabernat H., Sirot J. First characterization of inhibitor-resistant TEM (IRT)  $\beta$ -lactamases in *Klebsiella pneumoniae* strains. Antimicrob Agents Chemother 1995; 39:2580-2.
  55. Sirot D., Recule C., Chaibi E.B., Bret L., Croize J., Chanal-Claris C., Labia R., Sirot J. A complex mutant of TEM-1  $\beta$ -lactamase with mutations encountered in both IRT-4 and extended-spectrum TEM-15, produced by an *Escherichia coli* clinical isolate. Antimicrob Agents Chemother 1997; 41:1322-5.
  56. Fiett J., Palucha A., Miaczynska B., Stankiewicz M., Przondo-Mordarska H., Hryniewicz W., Gniadkowski M. A novel complex mutant beta-lactamase, TEM-68, identified in a *Klebsiella pneumoniae* isolate from an outbreak of extended-spectrum beta-lactamase-producing Klebsiellae. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44:1499-505.
  57. Winokur P.L., Eidelstein M.V., Stetsiouk O., Stratchounski L., Blahova J., Reshedko G.K., Croco M.A.T., Hollis R.J., Pfaller M.A., Jones R.N. Russian *Klebsiella pneumoniae* isolates that express extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. Clin Microbiol Infect 2000; 6:103-8.
  58. Payne D.J., Farmer T.H. Biochemical and enzyme kinetic Applications for the Characterization of  $\beta$ -lactamases. In: Woodford N., Johnson A.P., editors. Molecular Bacteriology. Protocols and Clinical Applications. Totowa, New Jersey: Humana Press; 1998. p. 513-35.
  59. Bolmstrom A., Nordstrom U., Kolar D. Etest for fingerprinting of bacteria producing  $\beta$ -lactamases. Proceedings of the 19th International Congress of Chemotherapy; Montreal; 1995. Abstr. P4226.
  60. Speldooren V., Heym B., Labia R., Nicolas-Chanoine M.-H. Discriminatory detection of inhibitor-resistant  $\beta$ -lactamases in *Escherichia coli* by single-strand conformation polymorphism-PCR. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42:879-84.
  61. Paniara O., Platsouka E., Dimopoulou H., Tzelepi E., Miragou V., Tzouveleki L.S. Diversity of beta-lactam resistance levels among related *Klebsiella pneumoniae* strains isolated in an intensive care unit. J Chemother 2000; 12:204-7.
  62. Cormican M.G., Marshall S.A., Jones R.N. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing strains by the E test ESBL screen. J Clin. Microbiol 1996; 34:1880-4.
  63. M'Zali F.H., Chanawong A., Kerr K.G., Birkenhead D., Hawkey P.M. Detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*: comparison of the MAST DD test, the double disc and the E test ESBL. J. Antimicrob. Chemother 2000; 45:881-5.
  64. Appleton A., Hall S. Evaluation of a novel diagnostic disc method for detection of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. Proceedings of the 3rd European Congress of Chemotherapy; Madrid; 2000. Abstr. T304.
  65. Mathew A., Harris A.M., Marshall M.J., Ross G.W. The use of analytical isoelectric focusing for detection and identification of beta-lactamases. J Gen Microbiol 1975; 88:169-78.
  66. Arstila T., Jacoby G.A., Huovinen P. Evaluation of five different methods to prepare bacterial extracts for the identification of  $\beta$ -lactamases by isoelectric focusing. J Antimicrob Chemother 1993; 32:809-16.
  67. Huovinen S. Rapid isoelectric focusing of plasmid-mediated beta-lactamases with Pharmacia PhastSystem. Antimicrob Agents Chemother 1988; 32:1730-2.
  68. Payne D.J., Thomson C.J. Molecular Approaches for the Detection and Identification of  $\beta$ -lactamases. Molecular Bacteriology. In: Woodford N., Johnson A.P., editors. Protocols and Clinical Applications. Totowa, New Jersey: Humana Press; 1998. p. 495-512.
  69. M'Zali F.H., Gascoyne-Binzi D.M., Heritage J., Hawkey P.M. Detection of mutations conferring extended-



- spectrum activity on SHV  $\beta$ -lactamases using polymerase chain reaction single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP). *J Antimicrob Chemother* 1996; 37: 797-802.
70. Cockerill III F.R. Genetic methods for assessing antimicrobial resistance. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:199-212.
  71. Saunders N.A., Clewley J.P. DNA amplification: general concepts and methods. In: Woodford N., Johnson A.P., editors. *Molecular Bacteriology. Protocols and Clinical Applications*. Totowa, New Jersey: Humana Press; 1998. p. 63-82.
  72. Mabilat C., Goussard S. PCR detection and identification of genes for extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. In: Persing D., Smith T., editors. *Diagnostic Molecular Microbiology. Principles and Applications*. Washington: ASM, 1993; p. 553-9.
  73. Bradford P.A. Automated thermal cycling is superior to traditional methods for nucleotide sequencing of *bla<sub>SHV</sub>* genes. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:2960-3.
  74. Ouellette M., Rossi J.J., Bazin R., Roy P.H. Oligonucleotide probes for the detection of TEM-1 and TEM-2  $\beta$ -lactamase genes and their transposons. *Can J Microbiol* 1987; 33:205-11.
  75. Mabilat C., Courvalin P. Development of «oligotyping» for characterization and molecular epidemiology of TEM  $\beta$ -lactamases in members of the family *Enterobacteriaceae*. *Antimicrob Agents Chemother* 1990; 34:2210-6.
  76. Tham T.N., Mabilat C., Courvalin P., Guesdon J.L. Biotinylated oligonucleotide probes for the detection and the characterization of TEM-type extended broad spectrum  $\beta$ -lactamases in *Enterobacteriaceae*. *FEMS Microbiol Lett* 1990; 57:109-15.
  77. Henquell C., Chanal C., Sirot D., Labia R., Sirot J. Molecular characterization of nine different types of mutants among 107 inhibitor-resistant TEM  $\beta$ -lactamases from clinical isolates of *Escherichia coli*. *Antimicrob Agents Chemother* 1995; 39:427-30.
  78. Tenover F.C., Huang M.B., Rasheed J.K., Persing D.H. Development of PCR assays to detect ampicillin resistance genes in cerebrospinal fluid samples containing *Haemophilus influenzae*. *J Clin Microbiol* 1994; 32: 2729-37.
  79. Sanchez-Pescador R., Stempien M.S., Urdea M.S. Rapid chemiluminescent nucleic acid assays for detection of TEM-1  $\beta$ -lactamase-mediated penicillin resistance in *Neisseria gonorrhoeae* and other bacteria. *J Clin Microbiol* 1988; 26:1934-8.
  80. Taylor G.R., editor. *Laboratory methods for the detection of mutations and polymorphisms in DNA*. Boca Raton: CRC Press.; 1997. p. 37-9.
  81. Arlet G., Brami G., Decre D., Flippo A., Gaillot O., Lagrange P.H., Philippon A. Molecular characterisation by PCR-restriction fragment length polymorphism of TEM  $\beta$ -lactamases. *FEMS Microbiol Lett* 1995; 134:203-8.
  82. Arlet G., Goussard S., Courvalin P., Philippon P. Sequences of the genes for the TEM-20, TEM-21, TEM-22, and TEM-29 extended-spectrum  $\beta$ -lactamases. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:969-71.
  83. Canica M.M., Lu C.Y., Krishnamoorthy R., Paul G.C. Molecular diversity and evolution of *bla<sub>TEM</sub>* genes encoding  $\beta$ -lactamases resistant to clavulanic acid in clinical *E. coli*. *J Mol Evol* 1997; 44:57-65.
  84. Nuesch-Inderbinen M.T., Hachler H., Kayser F.H. Detection of genes coding for extended-spectrum SHV beta-lactamases in clinical isolates by a molecular genetic method, and comparison with the E test. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 1996; 15:399-402.
  85. Hujer K.M., Hujer A.M., Bonomo R.A. Site-saturation mutagenesis of the 238 position in the SHV-1 beta-lactamase. *Proceedings of the 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. San Francisco; 1999. Abstr. 2051.
  86. Orita M., Ivahana H., Kanazawa H., Hayashi K., Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformational polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:2766-70.
  87. Widjoatmojo M.N., Fluit A.C., Verhoef J. Rapid Identification of Bacteria by PCR-Single-Strand Conformation Polymorphism. *J Clin Microbiol* 1994; 32:3002-7.
  88. M'Zali F.H., Heritage J., Gascoyne-Binzi D.M., Sneling A.M., Hawkey P.M. PCR single strand conformational polymorphism can be used to detect the gene encoding SHV-7 extended-spectrum  $\beta$ -lactamase and to identify different SHV genes within the same strain. *J Antimicrob Chemother* 1998; 41:123-5.
  89. Chanawong A., M'Zali F.H., Heritage J., Lulitanond A., Hawkey P.M. Characterisation of extended-spectrum  $\beta$ -lactamases of the SHV family using a combination of PCR-single strand conformational polymorphism (PCR-SSCP) and PCR-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP). *FEMS Microbiol Lett*; 1:85-9.
  90. Edelstein M.V., Strachounski L.S. Development of single-strand conformational polymorphism (SSCP) PCR Method for discriminatory detection of genes coding for TEM-family  $\beta$ -lactamases. *Proceedings of the 38th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. San Diego; 1998. Abstr. E-96.
  91. Edelstein M., Edelstein I., Suvorov M., Kozlov R. Differentiation of SHV-type  $\beta$ -lactamases by REF-SSCP analysis of entire *bla<sub>SHV</sub>* gene sequence *Proceedings of the 10th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*. Stockholm; 2000. Abstr. TuP233.
  92. Kim J., Kwon Y. Development of ligase chain reaction (LCR)-PCR method for discriminatory detection of genes coding for SHV variants. *Proceedings of the 39th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. San Francisco; 1999. Abstr. 2051.

УДК [615.33:577.18].07

## Моксифлоксацин – фторхинолон нового поколения с широким спектром активности

(Обзор литературы)

Л.С. Стречунский, В.А. Кречиков

НИИ антимикробной химиотерапии, Смоленск, Россия

Моксифлоксацин – новый 8-метоксихинолон широкого спектра действия с высокой активностью в отношении грам(+) и грам(-) аэробной микрофлоры, анаэробов и внутриклеточных возбудителей. Он обладает также активностью против микроорганизмов, резистентных к другим классам антибактериальных препаратов, включая макролидо- и пенициллинорезистентные пневмококки и  $\beta$ -лактамазопродуцирующие штаммы *Haemophilus influenzae*. В контролируемых клинических исследованиях были продемонстри-

рованы высокая эффективность и безопасность моксифлоксацина при внебольничной пневмонии, обострениях хронического бронхита, синусите, инфекциях кожи, мягких тканей, органов малого таза.

В статье представлен обзор результатов микробиологических и клинических исследований действия моксифлоксацина.

**Ключевые слова:** моксифлоксацин, фторхинолоны, респираторные инфекции.

## Moxifloxacin – the New Fluoroquinolon with Broad Spectrum of Activity

(The Literature Review)

L.S. Stratchounski, V.A. Kretchikov

Research Institute of Antimicrobial Chemotherapy, Smolensk, Russia

Moxifloxacin – new broad spectrum 8-methoxyquinolon with high activity against Gram(+) and Gram(-) microorganisms as well as against anaerobes and intracellular pathogens. It is also active against microorganisms that are resistant to other classes of antimicrobials, including penicillin- and macrolide-resistant pneumococci and  $\beta$ -lactamase-producing *Haemophilus influenzae*. In the controlled clinical trials the high clinical efficacy and

safety of moxifloxacin have been demonstrated for community-acquired pneumonia, exacerbation of chronic bronchitis, acute sinusitis, skin and soft tissue infections, pelvic inflammatory diseases.

In the article the literature review of microbiological studies and clinical trials on moxifloxacin is presented.

**Key words:** moxifloxacin, fluoroquinolones, respiratory tract infections.

### Введение

Когда появились первые хинолоны, никто не ожидал, что их ждет такое блестящее будущее: из небольшой группы препаратов, использовавшихся для лечения инфекций *мочевыводящих путей*

(МВП), они превратились в один из доминирующих классов антибиотиков.

На протяжении более 20 лет налидиксовая кислота и ее производные использовались только для лечения инфекций МВП. Вторая волна развития хинолонов связана с появлением фторированных соединений с гораздо более высокой активностью в отношении широкого спектра грамотрицательных микроорганизмов, некоторых грамположительных возбудителей (*Staphylococcus aureus*), улучшенной

Контактный адрес:  
Владимир Анатольевич Кречиков  
214019, Россия, Смоленск, а/я 5  
Факс: (0812) 61-12-94  
Эл. почта: zvall@antibiotic.ru

Таблица 1. Классификация хинолонов/фторхинолонов [1, с дополнениями]

Поколение	Препарат	Спектр активности
I – нефторированные хинолоны	Налидиксовая кислота Оксолиновая кислота Пипемидовая кислота	В основном грам(-) микрофлора (семейство <i>Enterobacteriaceae</i> )
II – «грамотрицательные» фторхинолоны	Норфлоксацин Ципрофлоксацин Пефлоксацин Офлоксацин Ломефлоксацин	Грам(-) микрофлора, <i>S. aureus</i> , низкая активность против <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>
III – «респираторные» фторхинолоны	Левовфлоксацин Спарфлоксацин Темафлоксацин*	↑ Активность против <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydomphila pneumoniae</i>
IV – «респираторные» + «антианаэробные» фторхинолоны	Тровафлоксацин* Клинафлоксацин* Моксифлоксацин Гемифлоксацин** BMS-284756**	↑ Активность против <i>Streptococcus pneumoniae</i> , <i>Mycoplasma pneumoniae</i> , <i>Chlamydomphila pneumoniae</i> , анаэробов

\* Отозван с рынка.

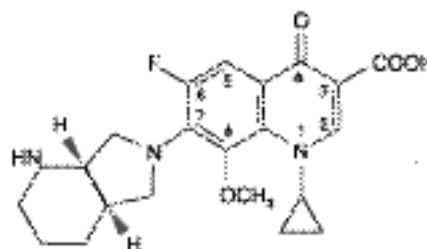
\*\* На стадии клинических испытаний.

фармакокинетикой, появлением форм для парентерального введения и вследствие этого расширением показаний для применения.

«Золотым стандартом» хинолонов II поколения стал ципрофлоксацин, который с большим успехом используется для лечения многих инфекций. К недостаткам препаратов этого поколения следует отнести низкую активность в отношении пневмококков, хламидий, микоплазм и анаэробов. Эти недостатки преодолены при разработке новых фторхинолонов III–IV поколений (табл. 1). Одним из первых препаратов этой группы был левовфлоксацин, активность которого против пневмококков и атипичных возбудителей превосходила предыдущие фторхинолоны.

Дальнейшие модификации химической структуры привели к появлению соединений, активных и в отношении анаэробов. Однако многие из вновь разработанных препаратов не достигли пациентов или были быстро отозваны с рынка вследствие развития тяжелых нежелательных реакций. Одним из новых препаратов, который стал успешно применяться, явился *моксифлоксацин* – представитель IV поколения фторхинолонов.

Наиболее важными в молекуле фторхинолонов, отвечающими за их антимикробные свойства, являются группы, занимающие позиции 1, 7 и 8. Циклопропиловый группа в положении 1 обеспечивает активность против грамотрицательных микроорганизмов (рис. 1). Присоединение дополнительного кольца в позиции 7 придает высокую активность по отношению к грамположительной микрофлоре, включая пневмококки. Добавление в структуру молекулы метоксигруппы в положении 8 привело к



1-Циклопропил-7-[6,5]-2,8-диаза-бисазоло(4,3-с)-8-ил)-6-фтор-1,4-дигидро-4-оксо-3-хинолонкарбоновой кислоты гидратхлорид

Рис. 1. Химическая структура моксифлоксацина [2]

повышению активности в отношении анаэробов без увеличения риска потенциальной фототоксичности [3].

### Механизм действия

Моксифлоксацин, как и все фторхинолоны, действует бактерицидно благодаря ингибированию ферментов класса топоизомераз – ДНК-гиразы (топоизомеразы II) и топоизомеразы IV (рис. 2). Эти ферменты выполняют строго определенные функции в процессе формирования пространственной структуры молекулы ДНК при ее репликации: ДНК-гираза катализирует расплетение (отрицательную суперспирализацию) нитей ДНК, а топоизомераза IV участвует в разъединении (декатенации) ковалентно-замкнутых кольцевых молекул ДНК. Ингибирование этих ферментов нарушает процессы роста и деления бактериальной клетки, что приводит к ее гибели.

Основной мишенью моксифлоксацина в грамположительных микроорганизмах преимущественно

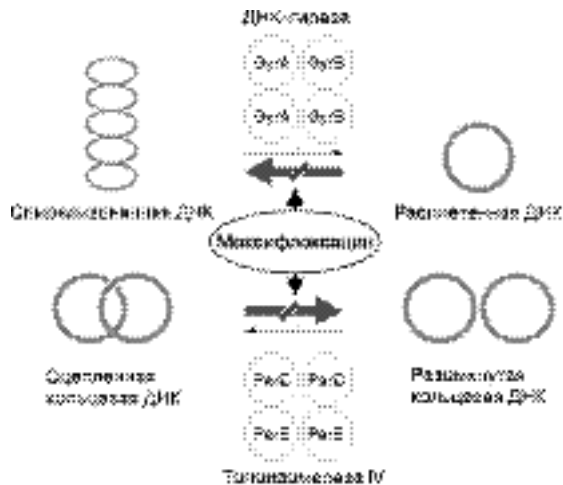


Рис. 3. Механизм действия моксифлоксацина

но является топоизомеразой IV, а в грамотрицательных – ДНК-гираза [4].

### Механизмы резистентности

Развитие резистентности связано с мутациями в генах *gyrA* и *gyrB* (кодируют ДНК-гиразу), *parC* (*grlA*) и *parE* (*grlB*) – кодируют топоизомеразу IV, а также в гене *norA* (кодирует мембранные белки, которые участвуют в активном выбросе – эффлюксе – фторхинолонов из клетки) [5]. Высокий уровень резистентности возникает вследствие сочетания этих механизмов [6].

Мутации, возникающие в генах *gyrA*, *gyrB*, *parC* и *parE*, значительно меньше влияют на активность моксифлоксацина, чем других фторхинолонов. Например, мутации у *S. aureus* в генах, кодирующих топоизомеразы, меньше снижают активность моксифлоксацина, чем ципрофлоксацина, офлоксацина, левофлоксацина, спарфлоксацина.

У *Escherichia coli* двойная мутация гена *gyrA* приводит к снижению  $IC_{50}^1$  норфлоксацина, ципрофлоксацина и спарфлоксацина по сравнению с таковой у немутировавшего типа более чем в 500 раз, в то время как для моксифлоксацина этот показатель не превышает 12 раз [7, 8].

Эффлюкс (мутация в гене *norA*) значительно меньше влияет на активность гидрофобных препаратов, таких, как моксифлоксацин, по сравнению с таковой у гидрофильных препаратов, например у ципрофлоксацина [7].

При применении моксифлоксацина вероятность

развития резистентности у грамположительных микроорганизмов, возможно, ниже, чем при применении других фторхинолонов, что связано с его высоким сродством как к топоизомеразе IV, так и к ДНК-гиразе [5, 8].

### Спектр активности

Моксифлоксацин обладает высокой активностью против грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов (включая микроорганизмы, устойчивые к другим классам антибиотиков), анаэробов и атипичных возбудителей.

### Грамположительные микроорганизмы

#### *Streptococcus pneumoniae*

Моксифлоксацин высокоактивен в отношении *S. pneumoniae*. По данным одного из самых больших исследований [9], включавшем 5640 штаммов, 99,8% из них были чувствительны к препарату, 0,1% – умеренно резистентны, 0,1% – резистентны; МПК<sub>90</sub> составила 0,25 мг/л (табл. 2). Моксифлоксацин обладает также высокой активностью в отношении полирезистентных пневмококков: МПК<sub>90</sub> моксифлоксацина для 138 штаммов, устойчивых к пенициллину, эритромицину и тетрациклину, составила 0,5 мг/л [14].

По активности в отношении пневмококка моксифлоксацин превосходит другие фторхинолоны (за исключением ситафлоксацина и гемифлоксацина): он в 2 раза активнее спарфлоксацина [9] и гатифлоксацина [15], в 4–8 раз – левофлоксацина [9, 12], в 8 раз – ципрофлоксацина и офлоксацина [12].

По сравнению с β-лактамами и макролидами активность моксифлоксацина в отношении полирезистентных *S. pneumoniae* значительно выше (табл. 3) [9].

#### *Streptococcus pyogenes*

Значение МПК<sub>90</sub> моксифлоксацина для *S. pyogenes* (β-гемолитический стрептококк группы А) составляет 0,06–0,25 мг/л. Моксифлоксацин в 2–4 раза активнее офлоксацина, ципрофлоксацина и левофлоксацина, обладает одинаковой активностью с гатифлоксацином [16, 17]. Наличие резистентности к макролидам не влияет на активность моксифлоксацина [17].

#### *Staphylococcus aureus*

Для метициллиночувствительных *S. aureus* (MSSA) МПК<sub>90</sub> моксифлоксацина находится в диапазоне 0,06–0,125 мг/л, в то время как для метициллинорезистентных штаммов (MRSA) МПК<sub>90</sub>, по данным разных авторов, значительно различается – от 0,06 до 8 мг/л [18]. По российским данным, МПК<sub>90</sub> моксифлоксацина для MRSA составила 0,125 мг/л, а диапазон МПК – 0,015–2 мг/л [19].

<sup>1</sup> В данной работе степень влияния мутаций *gyrA* и *parC* на чувствительность *E. coli* к фторхинолонам оценивалось как  $IC_{50}$  – концентрация фторхинолона, подавляющая активность фермента на 50%.

Таблица 2. Активность моксифлоксацина *in vitro* против *S. pneumoniae*, мг/л

Авторы [ссылка]	<i>S. pneumoniae</i>	Диапазон МПК	МПК <sub>50</sub>	МПК <sub>90</sub>
M. Jones et al. [9]	Пен-Ч (n=3603)	≤0,002–2,0	НД*	0,25
	Пен-УР (n=1267)	≤0,002–4,0	НД*	0,25
	Пен-Р (n=770)	0,01–4,0	НД*	0,25
J. Blondeau et al. [10]	Пен-Ч (n=501)	0,031–2,0	0,125	0,25
	Пен-УР (n=109)	0,031–0,125	0,125	0,25
	Пен-Р (n=11)	0,125–1,0	0,125	0,25
E. Losa et al. [11]	Пен-Ч (n=107)	0,03–0,25	0,12	0,25
	Пен-УР (n=80)	0,03–0,25	0,12	0,12
	Пен-Р (n=76)	0,03–2,0	0,12	0,25
A. Vuxbaum et al. [12]	Пен-Ч (n=1317)	0,01–0,5	0,125	0,25
	Пен-УР (n=40)	0,01–0,5	0,125	0,25
	Пен-Р (n=28)	0,01–0,5	0,125	0,25
С. Сидоренко и соавт. [13]	Все штаммы (n=190)	0,064–0,5	0,125	0,25

Пневмококки: Пен-Ч – пенициллиночувствительные, Пен-УР – умеренно-резистентные к пенициллину, Пен-Р – пенициллинорезистентные.

\*НД – нет данных.

Таблица 3. Сравнительная активность моксифлоксацина *in vitro* против *S. pneumoniae*, мг/л (n=5640) [9]

Антибиотик	Пен-Ч		Пен-Р	
	Диапазон МПК	МПК <sub>90</sub>	Диапазон МПК	МПК <sub>90</sub>
Моксифлоксацин	≤0,002–2	0,25	0,01–4	0,25
Пенициллин	≤0,03–0,06	0,06	2–>8	4
Амоксициллин/клавуланат	≤0,01–0,5	0,03	0,25–>16	4
Цефуроксим	≤0,12–1	≤0,12	≤0,12–64	8
Цефтриаксон	≤0,01–0,5	≤0,06	≤0,01–8	2
Эритромицин	≤0,03–>4	0,03	≤0,03–>4	4
Азитромицин	≤0,03–>4	0,06	≤0,03–>4	>4
Кларитромицин	≤0,01–>32	0,03	≤0,01–>32	>32

Пневмококки: Пен-Ч – пенициллиночувствительные, Пен-Р – пенициллинорезистентные.

Моксифлоксацин в 8 раз активнее ципрофлоксацина и в 2–4 раза – левофлоксацина против MSSA [16, 18]. По данным М. Jones и соавт., моксифлоксацин является одним из самых активных в отношении стафилококков фторхинолоном: МПК<sub>90</sub> моксифлоксацина для MRSA, резистентных к ципрофлоксацину, составила 2 мг/л, что было равно МПК<sub>90</sub> ванкомицина [18].

#### Грамотрицательные микроорганизмы (табл. 4)

##### *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*

Моксифлоксацин имеет очень высокую активность в отношении *H. influenzae* и *M. catarrhalis*, включая штаммы, резистентные к аминопенициллинам, вследствие продукции β-лактамаз.

##### *Escherichia coli*

Как и все другие фторхинолоны, моксифлоксацин обладает высокой активностью по отношению к *E. coli*, при этом несколько уступая ципрофлоксацину, что, однако, не имеет клинического значения [20, 21].

##### *Klebsiella spp.*

Моксифлоксацин более активен, чем β-лактамы антибиотиков (амоксициллин/клавуланат, цефуроксим), близок по активности к офлоксацину и незначительно уступает ципрофлоксацину [20, 21]. На штаммы *E. coli* и *K. pneumoniae*, продуцирующие ESBL и резистентные к ципрофлоксацину, моксифлоксацин не действует [22].

##### *Neisseria gonorrhoeae*

Для моксифлоксацина характерна очень высо-



Таблица 4. Активность моксифлоксацина в отношении аэробных грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, мг/л

Микроорганизм [ссылка]	Диапазон МПК	МПК <sub>90</sub>
<b>Грамположительные микроорганизмы</b>		
<i>S. pneumoniae</i> [9]	≤0,002–4,0	0,25
<i>S. pyogenes</i> [17, 21]	0,06–0,25	0,25
<i>S. aureus</i> (MSSA) [18, 21]	0,03–0,12	0,12
<i>S. aureus</i> (MRSA) [18, 19, 21]	<0,06–4,0	0,06–8,0
<b>Грамотрицательные микроорганизмы</b>		
<i>H. influenzae</i> [9]	≤0,002–0,25	0,06
<i>M. catarrhalis</i> [9]	≤0,002–0,5	0,06
<i>E. coli</i> [20]	0,03–0,5	0,06
<i>Klebsiella</i> spp. [21]	0,06–4,0	0,5
<i>N. gonorrhoeae</i> [21]	0,004–0,125	0,015
<i>P. aeruginosa</i> [15, 20, 21]	0,12–64,0	8– >32

кая активность против *N. gonorrhoeae*, которая несколько ниже, чем у ципрофлоксацина [21].

#### ***Pseudomonas aeruginosa***

Моксифлоксацин уступает ципрофлоксацину по активности против синегнойной палочки. МПК<sub>90</sub> моксифлоксацина, по данным разных авторов, находится в диапазоне от 8 до 32 мг/л и более, а МПК<sub>90</sub> ципрофлоксацина – от 0,5 до 16 мг/л [15, 20, 21].

#### **Внутриклеточные возбудители (табл. 5)**

##### ***Chlamydia* spp.**

В отношении *C. trachomatis* моксифлоксацин превосходит не только эритромицин, азитромицин, доксициклин и ципрофлоксацин, но и офлоксацин, что открывает перспективы для его применения в лечении урогенитальных инфекций.

По активности против *C. pneumoniae* моксифлоксацин находится на одном уровне с левофлоксацином и более активен по сравнению с ципрофлоксацином.

##### ***Mycoplasma pneumoniae***

Моксифлоксацин обладает большей активностью, чем тетрациклин (МПК<sub>90</sub> = 0,25 мг/л), доксициклин, ципрофлоксацин и левофлоксацин, однако уступает кларитромицину и азитромицину [27, 28].

##### ***Mycoplasma hominis***

По активности против *M. hominis* моксифлоксацин значительно превосходит доксициклин, кларитромицин, левофлоксацин и ципрофлоксацин [28, 30].

##### ***Ureaplasma urealyticum***

Моксифлоксацин незначительно уступает кларитромицину и проявляет высокую активность как в отношении чувствительных (МПК<sub>90</sub> – 0,25 мг/л), так и резистентных к доксициклину штаммов (МПК<sub>90</sub> – 0,5 мг/л). Моксифлоксацин активнее доксициклина, эритромицина, ципрофлоксацина и левофлоксацина [28, 30].

##### ***Legionella* spp.**

Моксифлоксацин превосходит по активности ципрофлоксацин и такой классический антибиотик для лечения легионеллезной инфекции, как эритромицин, но несколько уступает кларитромицину и рифампицину [31, 32].

#### ***Mycobacterium* spp. (табл. 6)**

Моксифлоксацин активен в отношении как чувствительных, так и полирезистентных штаммов *M. tuberculosis* и превосходит ципрофлоксацин, офлоксацин и левофлоксацин. МПК<sub>90</sub> моксифлоксацина для полирезистентных штаммов составляет 0,5 мг/л [33, 34].

Таблица 5. Активность моксифлоксацина в отношении внутриклеточных возбудителей, МПК<sub>90</sub>, мг/л

Микроорганизм	Моксифлоксацин	Левофлоксацин	Ципрофлоксацин	Азитромицин	Кларитромицин	Эритромицин	Доксициклин	Ссылка
<i>C. trachomatis</i>	0,06	–	1–2	0,06–0,125	0,015	0,25–0,5	0,25	21, 24, 26
<i>C. pneumoniae</i>	0,06–1	1	1–2	0,125–0,25	0,06	0,125	0,25	23, 24, 25
<i>M. pneumoniae</i>	0,063–0,125	0,5	1	≤0,008	≤0,008–0,06	–	0,12	27, 28, 29
<i>M. hominis</i>	0,06	1	4	–	>32	≥16	4–16	28, 30
<i>U. urealyticum</i>	0,25	1	4	–	0,12	8	0,5–1	28, 30
<i>Legionella</i> spp.	0,016–0,06	0,016–0,03	0,06	0,5	0,004	0,12–0,5	8	31, 32

Таблица 6. Активность моксифлоксацина в отношении микобактерий, МПК<sub>90</sub>, мг/л

Микроорганизм	Моксифлоксацин	Ципрофлоксацин	Офлоксацин	Левифлоксацин	Изониазид	Ссылка
<i>M. tuberculosis</i>	0,25	0,5	0,5	>0,25	0,1	33, 34
<i>M. kansasii</i>	0,06	1	–	0,5	–	33
<i>M. avium-intracellulare</i>	1	4	–	4	–	33

По отношению к атипичным микобактериям (*M. kansasii*, *M. avium-intracellulare*) моксифлоксацин превосходит ципрофлоксацин и левифлоксацин [33].

### Анаэробы (табл. 7)

В отличие от фторхинолонов II–III поколений (ципрофлоксацин, офлоксацин, левифлоксацин) моксифлоксацин обладает высокой активностью против анаэробов (как неспорообразующих, так и спорообразующих). По антианаэробной активности моксифлоксацин сравним с имипенемом, метронидазолом и клиндамицином [35, 36].

Таблица 7. Активность моксифлоксацина в отношении анаэробов, мг/л [35, 36]

Микроорганизм	Диапазон МПК	МПК <sub>90</sub>
Анаэробные грамположительные кокки	0,008–2,0	0,25
<i>Bacteroides fragilis</i>	0,125–2,0	0,5
<i>Fusobacterium</i> spp.	0,032–4,0	1,0
<i>Clostridium perfringens</i>	0,25–0,5	0,5
<i>Clostridium difficile</i>	1,0–2,0	2,0

### Постантибиотический эффект

Фторхинолоны обладают выраженным *постантибиотическим эффектом* (ПАЭ) против грамположительных и грамотрицательных микроорганизмов, который в среднем равен 2 ч.

ПАЭ моксифлоксацина для разных микроорганизмов составляет 1,2–3,1 ч при концентрации, равной 4 МПК, и увеличивается с возрастанием концентрации препарата. Например, ПАЭ для *S. pneumoniae* равно 2,2 ч при концентрации препарата 4 МПК и возрастает до 2,7 ч при его концентрации 10 МПК [37].

### Фармакокинетика

#### Всасывание

Моксифлоксацин практически полностью всасывается из желудочно-кишечного тракта при приеме внутрь. Биодоступность составляет от 86 [38] до 91,8% [39]. При внутривенном введении 400 мг в течение 1 ч значения максимальной концентрации

препарата в плазме ( $C_{max}$ ) и площади под фармакокинетической кривой (ПФК) незначительно больше, чем при приеме 400 мг внутрь [38, 40].

Максимальная концентрация препарата в плазме ( $C_{max}$ ) в исследовании H. Stass и соавт. [38, 39] составила 2,5 мг/л через 2 ч после приема внутрь 400 мг. В то же время в исследованиях R. Wise и соавт. [40] и A. Lubasch и соавт. [41] максимальная концентрация была 4,34–4,98 мг/л и достигалась через 1 ч. Прием пищи, включая молочные продукты, не влияет на всасывание моксифлоксацина [42, 43].

### Распределение

При приеме внутрь моксифлоксацин имеет большой объем распределения ( $V_d$ ): 3,08–3,55 л/кг [2, 38] и достигает высоких концентраций в тканях и жидкостях организма: в бронхиальном секрете, альвеолярных макрофагах, тканях верхнечелюстной пазухи и жидкости, покрывающей эпителий бронхов (табл. 8).

Концентрация моксифлоксацина в жидкостях дыхательных путей значительно превышает МПК<sub>90</sub> для основных возбудителей респираторных инфекций (табл. 4, 5).

Моксифлоксацин связывается с белками плазмы на 39,4–48%, что несколько выше, чем у ципрофлоксацина (35%) [2, 38].

### Метаболизм

Моксифлоксацин метаболизируется в печени путем конъюгации с образованием двух метаболитов: М1 (ацетилглюкуронид) и М2 (сульфопроизводное моксифлоксацина). М1 имеет высокую

Таблица 8. Концентрация моксифлоксацина в жидкостях и тканях организма\*

Локус [ссылка]	Максимальная концентрация (соотношение ткань / плазма)	Концентрация через 24 ч (соотношение ткань / плазма)
Слизистая оболочка верхнечелюстной пазухи [44]	7,47 мг/кг (1,9)	1,47 мг/кг (2,5)
Бронхиальный секрет [45]	5,4 мг/кг (1,7)	1,1 мг/кг (2,1)
Альвеолярные макрофаги [45]	56,7 мг/л (18,6)	35,9 мг/л (70,0)
Жидкость, покрывающая эпителий бронхов [45]	20,7 мг/л (6,8)	3,6 мг/л (1,4)

\* После приема 400 мг препарата внутрь.

степень связывания с белками плазмы (89,5%), а M2 практически не связывается – 4,8% (рис. 3) [38].

### Выведение

При однократном приеме 400 мг моксифлоксацина внутрь более 96% дозы выводится через почки и желудочно-кишечный тракт, при этом с мочой экскретируется 15,1–35,4% препарата [2, 38, 40]. В неизменном виде через почки выводится 19,4% дозы; метаболита M1 – 2,5% и в виде метаболита M2 – 13,6%. С фекалиями в неизменном виде выводится 25,4% дозы и 35,5% – в виде метаболита M1.

По данным большинства авторов, период полувыведения составляет 12–13 ч, что больше, чем у ципрофлоксацина, офлоксацина и левофлоксацина. Длительный период полувыведения позволяет принимать препарат 1 раз в сутки в отличие от

большинства фторхинолонов II поколения [2, 38, 40, 41]. Другие фармакокинетические параметры приведены в табл. 9.

### Влияние возраста, заболеваний печени и почек

У взрослых возраст практически не влияет на фармакокинетические свойства моксифлоксацина, но значения максимальной концентрации препарата в плазме и ПФК несколько выше у пожилых женщин по сравнению с таковыми у молодых и пожилых мужчин [46].

В отличие от офлоксацина и левофлоксацина при легкой почечной недостаточности – клиренс креатинина  $>30$  мл/(мин·1,73 м<sup>2</sup>) – период полувыведения остается неизменным и составляет 14,5 ч [47]. Однако пока нет достаточной информации о применении моксифлоксацина при клиренсе креатинина  $<30$  мл/(мин·1,73 м<sup>2</sup>) или при гемодиализе,

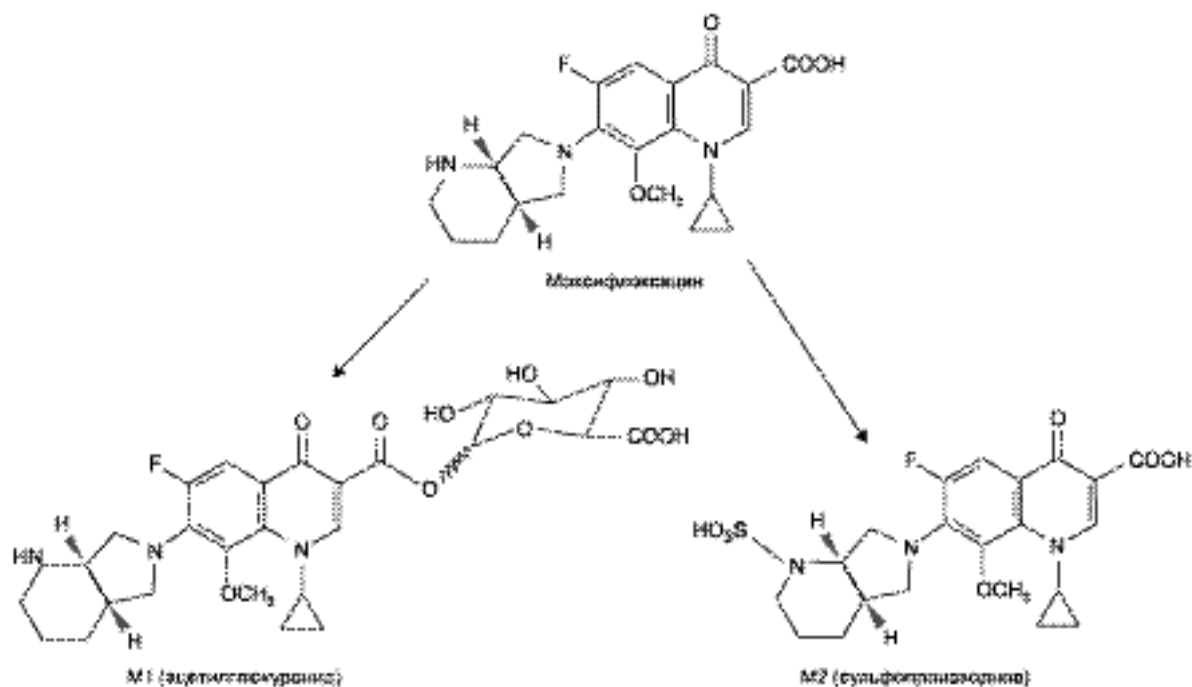


Рис. 3. Метаболизм моксифлоксацина в печени [38]

Таблица 9. Фармакокинетические свойства моксифлоксацина

Авторы [ссылка]	Количество пациентов	Путь введения*	$T_{max}$ , ч	$C_{max}$ , мг/л	ПФК, мг/(л·ч)	$V_d$ , л/кг	CL, л/ч	Кларитро, л/ч	$T_{1/2}$ , ч
H. Stass, D. Kubitzka [38]	12	Внутрь	2,0	2,50	29,8	3,08	11,6	2,58	15,6
		Внутривенно	1,0	3,62	34,6	2,05	11,6	2,61	15,4
R. Wise et al. [40]	8	Внутрь	1,0	4,98	45,49	–	8,87	1,34	8,32
		Внутривенно	–	5,09	45,34	–	9,09	1,38	8,17
H. Stass et al. [2]	7	Внутрь	1,50	2,50	26,90	3,55	14,90	3,03	13,1
A. Lubasch et al. [41]	12	Внутрь	1,02	4,34	39,3	–	–	1,83	9,15

\* Препарат вводился однократно в дозе 400 мг.

$C_{max}$  – максимальная концентрация в плазме,  $T_{max}$  – время достижения  $C_{max}$ , ПФК – площадь под фармакокинетической кривой,  $V_d$  – объем распределения, CL – клиренс препарата из плазмы, Кларитро – почечный клиренс,  $T_{1/2}$  – период полувыведения.

поэтому препарат не следует назначать этим категориям пациентов.

У пациентов с легкой и среднетяжелой печеночной недостаточностью ( $n=8$ ) значения  $C_{max}$ , ПФК и  $T_{1/2}$  оказались меньше, чем у здоровых добровольцев ( $n=10$ ):  $C_{max}$  – 2,55 и 3,02 мг/л, ПФК – 25,1 и 32,8 мг/(л·ч),  $T_{1/2}$  – 11,7 и 13,4 ч соответственно [48]. В целом пока мало данных о применении моксифлоксацина у пациентов с печеночной недостаточностью.

Как видно из данных табл. 9, нет существенных различий между фармакокинетическими параметрами при приеме моксифлоксацина внутрь и при внутривенном введении. Это позволит при появлении на рынке формы для парентерального введения использовать моксифлоксацин в ступенчатой терапии с ранним переходом на прием препарата внутрь.

### Фармакодинамика

В настоящее время все большее внимание уделяется фармакодинамическим свойствам антибиотиков, которые значительно влияют на их эффективность. Считается, что для фторхинолонов условиями эффективности являются значения отношений [49, 50]:

- максимальной концентрации в плазме к МПК ( $C_{max}/\text{МПК}$ ) более 10;
- ПФК к МПК (ПФК/МПК) более 100–125 (более 40–50 для *S. pneumoniae*);

– ПФК к МПК фракции препарата, несвязанной с белками плазмы (ПФК/МПК<sub>несвяз.</sub>) более 25–30.

По результатам *in vitro* моделирования с использованием респираторных патогенов, значения ПФК/МПК и ПФК/МПК<sub>несвяз.</sub> для моксифлоксацина выше, чем для других фторхинолонов (табл. 10).

### Клиническое применение

Моксифлоксацин изучался при заболеваниях дыхательных путей (внебольничная пневмония, обострение хронического бронхита, острый синусит), инфекциях кожи и мягких тканей, а также при гинекологических инфекциях.

### Внебольничная пневмония

Моксифлоксацин привлекает особое внимание при лечении внебольничной пневмонии в связи с его высокой активностью в отношении фактически всех наиболее вероятных возбудителей, включая полирезистентные пневмококки, гемофилы, продуцирующие  $\beta$ -лактамазы, а также внутриклеточные (атипичные) возбудители *M. pneumoniae* и *C. pneumoniae* [9, 25, 27].

Ни один из других классов антибактериальных препаратов не обладает таким широким спектром активности и способностью преодолевать приобретенную резистентность респираторных патогенов, как новые фторхинолоны. Например, к макролидам в последнее время часто отмечается ассоциирован-

Таблица 10. Фармакодинамические свойства моксифлоксацина\* [49]

Антибиотик	Доза	МПК, мг/л	ПФК/МПК	ПФК/МПК <sub>несвяз.</sub>
Ципрофлоксацин	500 мг 2 раза в сутки	2	10	7
Ципрофлоксацин	750 мг 2 раза в сутки	2	14	10
Левифлоксацин	500 мг 1 раз в сутки	1	50	35
Моксифлоксацин	400 мг 1 раз в сутки	0,25	120	60

\* Данные получены в модели *in vitro* с использованием полирезистентных штаммов *S. pneumoniae*.

Таблица 11. Эффективность моксифлоксацина при лечении внебольничной пневмонии

Авторы [ссылка], дизайн	Препараты сравнения	Количество пациентов	Режим дозирования	Курс, дней	Эффективность*, %		Вывод
					клиническая	бактериологическая	
С. Fogarty et al. [52], Р, ДС	Мокси	194	400 мг 1 раз в сутки	10	94,8**	97,1	Мокси = Кларитро
	Кларитро	188	500 мг 2 раза в сутки	10	94,7**	96,0	
G. Hoffken et al. [53], Р, ДС	Мокси	180	200 мг 1 раз в сутки	10	93,9	90,6	КЭ: Мокси 200 мг = Мокси 400 мг = Кларитро БЭ: Мокси 200 мг = Мокси 400 мг = Кларитро
	Мокси	177	400 мг 1 раз в сутки	10	94,4	90,2	
	Кларитро	174	500 мг 2 раза в сутки	10	94,3	85,3	
P. Petipretz et al. [54], Р, ДС	Мокси	177	400 мг 1 раз в сутки	10	91,5	89,7	Мокси = Амокс
	Амокс	185	1 г 3 раза в сутки	10	89,7	82,4	

Мокси – моксифлоксацин, Кларитро – кларитромицин, Амокс – амоксициллин, КЭ – клиническая эффективность, БЭ – бактериологическая эффективность, Р – рандомизированное исследование, ДС – двойное слепое исследование.

\* После окончания лечения.

\*\* Общая эффективность.

ная резистентность: 45% пенициллинорезистентных пневмококков устойчивы к эритромицину [51], в то время как МПК<sub>90</sub> моксифлоксацина для таких штаммов составляет 0,5 мг/л [14].

Хорошие микробиологические характеристики сочетаются с благоприятной фармакокинетикой и фармакодинамикой моксифлоксацина: длительный период полувыведения, обеспечивающий однократный прием, высокие концентрации в тканях бронхов и легких, оптимальные значения показателей ПФК/МПК и ПФК/МПК<sub>несвяз.</sub> [49].

В обзоре приведены данные 3 рандомизированных двойных слепых исследований клинической и бактериологической эффективности моксифлоксацина при внебольничной пневмонии (табл. 11). В 2 исследованиях сравнивали эффективность моксифлоксацина и кларитромицина. По клинической эффективности они были равны – 94–95% [52, 53]. По данным G. Hoffken и соавт., бактериологическая эффективность моксифлоксацина выше<sup>2</sup>, чем кларитромицина – 90 и 85% соответственно [53].

При внебольничной пневмококковой пневмонии клиническая эффективность моксифлоксацина оказалась такой же как у амоксициллина, а у пациентов, у которых был выделен нечувствительный к пенициллину пневмококк, была выше<sup>2</sup> – 89,7 против 82,4%. Частота эрадикации возбудителя составила 89,6 и 84,8%, соответственно [54].

По данным метаанализа 4 многоцентровых исследований, в которых сравнивали эффективность моксифлоксацина и кларитромицина или амоксициллина, при приеме моксифлоксацина излечение

наступало в 91% случаев, а эрадикация возбудителя – в 96% случаев по сравнению с эрадикацией в 86% случаев для амоксициллина и в 90% – для кларитромицина [55]. МПК моксифлоксацина для пневмококка составила 0,125 мг/л вне зависимости от чувствительности к пенициллину или кларитромицину.

### Обострение хронического бронхита

При лечении обострения хронического бронхита, вызванного бактериальными возбудителями, в двух рандомизированных двойных слепых исследованиях сравнивали действие моксифлоксацина и кларитромицина (табл. 12). Ни у одного препарата не выявлено преимуществ по клинической эффективности после окончания лечения [56, 57]. Однако следует отметить, что бактериологическая эффективность моксифлоксацина была статистически значимо выше, чем кларитромицина: 91,3 и 68,4% соответственно (95% ДИ<sup>3</sup>: 8,5 и 27,7%) [57].

При терапии моксифлоксацином эрадикация *H. influenzae* наступала чаще (100%), чем при применении кларитромицина (83%), а частота эрадикации остальных микроорганизмов была одинаковой [56].

Аналогичная ситуация наблюдалась и в исследовании R. Wilson и соавт.: эрадикация *H. influenzae* наступала через 14 дней после окончания лечения в 90,9% случаев при приеме моксифлоксацина и в 53,5% – при приеме кларитромицина [57].

По результатам рандомизированного открытого исследования, моксифлоксацин превосходил по клинической эффективности амоксициллин/кла-

<sup>2</sup> Данных о статистической значимости различий нет.

<sup>3</sup> Доверительный интервал.



Таблица 12. Эффективность моксифлоксацина при лечении обострений хронического бронхита

Авторы [ссылка], дизайн	Препараты сравнения	Количество пациентов	Режим дозирования	Курс, дней	Эффективность*, %		Вывод
					клиническая	бактериологическая	
S. Chodosh et al. [56], Р, ДС	Мокси	143	400 мг 1 раз в сутки	5	94,1	94,1	Мокси 5 дней = Мокси 10 дней = Кларитро
	Мокси	148	400 мг 1 раз в сутки	10	94,4	95,2	
	Кларитро	129	500 мг 2 раза в сутки	10	95,3	90,6	
R. Wilson et al. [57], Р, ДС	Мокси	322	400 мг 1 раз в сутки	5	94,4	91,3**	КЭ: Мокси = Кларитро БЭ: Мокси > Кларитро
	Кларитро	327	500 мг 2 раза в сутки	7	93,8	68,4**	
T. Schaberg et al. [58], Р, О	Мокси	261	400 мг 1 раз в сутки	5	96,2**	–	Мокси ≥ Амокс/клав
	Амокс/клав	251	625 мг 3 раза в сутки	7	91,6**	–	
S. Kreis et al. [59], Р, О	Мокси	179	400 мг 1 раз в сутки	5	84,9	–	Мокси = Азитро
	Азитро	176	500 мг 1 раз в сутки	5	81,3	–	
				1, 250 мг 1 раз в сутки в дни 2–5			

Мокси – моксифлоксацин, Кларитро – кларитромицин, Амокс/клав – амоксициллин/клавуланат, Азитро – азитромицин, КЭ – клиническая эффективность, БЭ – бактериологическая эффективность, Р – рандомизированное исследование, ДС – двойное слепое исследование, О – открытое исследование.

\* После окончания лечения.

\*\* Статистически значимо.

вуланат (табл. 12) [58]. Частота выздоровления через 7 дней лечения моксифлоксацином была статистически значимо выше, чем при приеме амоксициллина/клавуланата: 96,2 и 91,6% соответственно (95% ДИ<sup>3</sup>: 0,4 и 8,7%).

При сравнении действия моксифлоксацина и азитромицина клиническая эффективность обоих препаратов была практически одинаковой – 85 и 81% соответственно. Однако при назначении моксифлоксацина излечение наступало быстрее, чем при лечении азитромицином: к 3-му дню терапии отметили разрешение симптомов 40% пациентов, принимавших моксифлоксацин, и 27% больных (p = 0,012), лечившихся азитромицином (рис. 4).

К 3-му дню терапии вернулись к нормальной активности 36% больных, лечившихся моксифлоксацином, и 26% пациентов, принимавших азитромицин [59].

В исследовании С. DeAbate и соавт. клиническая эффективность моксифлоксацина и азитромицина была одинаковой (88%). Однако частота эрадикации *H. influenzae* и *H. parainfluenzae* при приеме моксифлоксацина (97 и 88%) была выше, чем при назначении азитромицина (83 и 62%) [60].

Как показал метаанализ 4 многоцентровых исследований, в которых сравнивали эффективность лечения обострения хронического бронхита моксифлоксацином и кларитромицином, при приеме моксифлоксацина клиническое излечение наступало в зависимости от преобладающего возбудителя в 92–100% случаев, а эрадикация микроорганизмов –

в 96–98%. Эрадикация *H. influenzae* при приеме моксифлоксацина наступала в 97% случаев против 72% при приеме кларитромицина [61].

В отличие от многих других антибиотиков моксифлоксацин достаточно принимать один раз в сутки более коротким курсом, что позволяет снизить число дней нетрудоспособности и расходы на лечение.

### Острый синусит

Клиническая и бактериологическая эффективность моксифлоксацина сравнивалась с эффективностью цефуроксима в двух рандомизированных двойных слепых исследованиях (табл. 13). Моксифлоксацин был или равен цефуроксиму [62], или

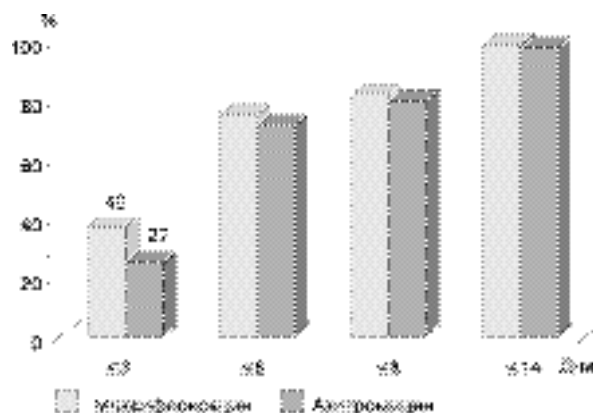


Рис. 4. Частота разрешения симптомов обострения хронического бронхита при приеме моксифлоксацина и азитромицина [59]

Таблица 13. Эффективность моксифлоксацина при лечении острого синусита

Авторы [ссылка], дизайн	Препарат сравнения	Количество пациентов	Режим дозирования	Курс, дней	Эффективность, * %		Вывод
					клиническая	бактериологическая	
T. Burke et al. [62], Р, ДС	Мокси Цефур	223 234	400 мг 1 раз в сутки 250 мг 2 раза в сутки	10 10	89,7 89,3	–	Мокси = Цефур
R. Siegert et al. [63], Р	Мокси Цефур	211 225	400 мг 1 раз в сутки 250 мг 2 раза в сутки	7 10	96,7** 90,7**	94,5** 83,5**	Мокси > Цефур

Мокси – моксифлоксацин, Цефур – цефуроским аксетил, Р – рандомизированное исследование, ДС – двойное слепое исследование.

\* После окончания лечения.

\*\* Статистически значимо.

превосходил его по клинической эффективности: 96,7 и 90,7% соответственно (95% ДИ: 1,5 и 10,6%) [63]. Бактериологическая эффективность, по данным R. Siegert и соавт., также была статистически значимо выше при приеме моксифлоксацина: 94,5 и 83,5% (95% ДИ: 3,6 и 19,7%) [63].

Метаанализ 4 многоцентровых исследований, в которых сравнивали эффективность моксифлоксацина и цефуросима, показал, что при приеме фторхинолона излечение наступало в 79–95% случаев (в среднем – в 91%), а эрадикация микроорганизмов – в 89–100% (в среднем – в 96%). При приеме цефуросима излечение наступало в 90% случаев, а эрадикация микроорганизмов – в 93% [64].

### Инфекции кожи и мягких тканей

Для лечения неосложненных инфекций кожи и мягких тканей моксифлоксацин применяли по 400 мг 1 раз в сутки в течение 7 дней. По результатам 3 рандомизированных двойных слепых исследований, моксифлоксацин не уступал по клинической и бактериологической эффективности цефалексину и комбинации цефалексина с метронидазолом (табл. 14) [65, 66, 67].

Уменьшение дозы моксифлоксацина до 200 мг существенно не влияло на клиническую эффективность: 95,2% при приеме 200 мг и 100% при приеме 400 мг [66].

### Гинекологические инфекции

Воспалительные заболевания органов малого таза вызываются разнообразными микроорганизмами. Среди них преобладают возбудители, передаваемые половым путем (*N. gonorrhoeae*, *C. trachomatis*), а также аэробы семейства *Enterobacteriaceae*, стрептококки и анаэробы, входящие в состав нормальной микрофлоры влагалища – *Bacteroides* spp., *Peptostreptococcus* spp., *G. vaginalis* и др. Поэтому препараты для терапии этих инфекций должны обладать высокой активностью в отношении данных микроорганизмов. Благодаря широкому спектру активности моксифлоксацина, включающему большинство возбудителей гинекологических инфекций, он может быть хорошей альтернативой традиционным 2–3-компонентным схемам лечения.

При терапии неосложненных воспалительных заболеваний органов малого таза у женщин моксифлоксацин (400 мг 1 раз в сутки, 14 дней) был сравним

Таблица 14. Эффективность моксифлоксацина при лечении инфекций кожи и мягких тканей

Авторы [ссылка], дизайн	Препарат сравнения	Количество пациентов	Режим дозирования	Курс, дней	Эффективность, %		Вывод
					клиническая	бактериологическая	
L. Parish et al. [65], Р, ДС	Мокси Цефал	180 171	400 мг 1 раз в сутки 500 мг 3 раза в сутки	7 7	90,0 90,6	91,2 91,2	Мокси = Цефал
P. Leal del Rosal et al. [66], Р, ДС	Мокси Мокси Цефал	21 22 26	200 мг 1 раз в сутки 400 мг 1 раз в сутки 500 мг 3 раза в сутки	5–14 5–14 5–14	95,2 100,0 88,5	72,2 80,0 80,0	Мокси = Цефал
P. Leal del Rosal et al. [67], Р, ДС	Мокси Цефал ± Метро	191 194	400 мг 1 раз в сутки 500 мг 3 раза в сутки 400 мг 3 раза в сутки	5–14 5–14	92,7 92,8	89,0 93,8	Мокси = Цефал ± Метро

Мокси – моксифлоксацин, Цефал – цефалексин, Метро – метронидазол, Р – рандомизированное исследование, ДС – двойное слепое исследование.

Таблица 15. Частота нежелательных реакций при приеме моксифлоксацина и других препаратов [70]

Нежелательная реакция	Моксифлоксацин – 400 мг, n=4370		Все препараты сравнения, n=3415		$\beta$ -Лактамы, n=1669		Макролиды, n=1166		Другие препараты сравнения*, n=580	
	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%	Абс. число	%
Тошнота	339	7,8	194	5,7	50	3,0	59	5,1	85	14,7
Диарея	258	5,9	157	4,6	73	4,4	54	4,6	30	5,2
Головная боль	87	2,0	67	2,0	22	1,3	21	1,8	24	4,1
Головокружение	127	2,9	37	1,1	15	0,9	10	0,9	12	2,1
Рвота	76	1,7	62	1,8	8	0,5	17	1,5	37	6,4
Боль в животе	86	2,0	57	1,7	18	1,1	21	1,8	18	3,1
Диспепсия	59	1,4	39	1,1	19	1,1	13	1,1	7	1,2
Изменение печеночных тестов	52	1,2	51	1,5	30	1,8	14	1,2	7	1,2
Извращение вкуса	46	1,1	85	2,5	13	0,8	65	5,6	7	1,2

\* Офлоксацин, доксицилин + метронидазол.

по клинической эффективности (96,6 и 98,0%) с комбинацией ципрофлоксацина (500 мг однократно), доксицилина (100 мг 2 раза в сутки) и метронидазола (500 мг 3 раза в сутки) в течение 14 дней [68].

Бактериологическая эффективность моксифлоксацина была выше<sup>4</sup>, чем в группе сравнения (92,5 и 88,2% соответственно).

### Переносимость и нежелательные реакции

По данным метаанализа 26 клинических исследований, включавших 6178 пациентов, которые принимали моксифлоксацин (400 мг), частота нежелательных реакций составила 26% и была сравнимой (23%) с препаратами выбора при лечении этих заболеваний [69].

Наиболее частыми нежелательными реакциями (табл. 15) были тошнота, диарея (14%) и головокружение (3%).

Метаанализ 20 клинических исследований<sup>5</sup>, включавших 4926 пациентов, показал, что при приеме моксифлоксацина (556 пациентов – по 200 мг, 4370 – по 400 мг) большинство нежелательных реакций были легкой или средней степени тяжести, проходили без лечения и не требовали отмены препарата. Наиболее частыми являлись тошнота (7,8%) и диарея (5,9%) [70].

В клинических исследованиях частота нежелательных реакций при приеме моксифлоксацина была аналогична частоте при приеме препаратов срав-

нения – кларитромицина [52, 53, 56, 57] и амоксицилина [54]. Только по данным T. Burke и соавт., при приеме моксифлоксацина частота приступов тошноты была статистически значимо выше, чем при приеме цефуроксим аксетила (11 и 4% соответственно,  $p=0,003$ ) [62]. Частота возникновения других нежелательных реакций оказалось аналогичной в группах сравнения.

### Изменение лабораторных показателей

Метаанализ 20 клинических исследований показал, что у 1,2% пациентов, принимавших моксифлоксацин, изменялись лабораторные показатели функций печени [70]. Сходные результаты получены в группах сравнения (1,2–1,8%).

### Фототоксичность

В исследованиях *in vitro* [71], на животных [71] и человеке [72, 73] моксифлоксацин не вызывал фототоксических реакций. Это особенно очевидно при сравнении моксифлоксацина с ломефлоксацином, при применении которого значительно (в 3–4 раза) повышается чувствительность кожи к световому излучению [72]. По результатам метаанализа, у 6178 пациентов, принимавших моксифлоксацин, не отмечено реакций фототоксичности [69].

### Влияние на сердечно-сосудистую систему

Как показал метаанализ, из 2650 пациентов, принимавших моксифлоксацин по 400 мг, удлинение интервала QT наблюдалось у 2,8%, что сходно с препаратами сравнения (2,2%) и ниже, чем при использовании кларитромицина (3,7%) [69]. Из более 1,2 млн человек, принимавших моксифлоксацин, только у 22 отмечены клинически значимые изме-

<sup>4</sup> Данных о статистической значимости различий нет.

<sup>5</sup> 5 исследований – острый синусит, 5 – внебольничная пневмония, 4 – обострение хронического бронхита, 3 – инфекции кожи и мягких тканей, 3 – другие заболевания. Сравнивали эффективность моксифлоксацина и препараты выбора при лечении этих заболеваний.

нения функции сердечно-сосудистой системы, 15 из которых оценены как тяжелые [69].

Описан также случай тахикардии (120 ударов в минуту), продолжавшийся 45 мин после приема 400 мг моксифлоксацина. Повторный прием препарата не вызвал тахикардии [74].

При сравнении действия моксифлоксацина (400 мг) с плацебо у здоровых добровольцев удлинение интервала *QT* составило 6,9 мс для препарата и 3,5 мс – для плацебо [75]. Одновременный прием моксифлоксацина и препаратов, удлиняющих интервал *QT*, не приводил к дополнительному его удлинению [76].

### **Влияние на костно-суставную систему**

По данным R. Kubin и C. Reiter, у более 1,2 млн человек, принимавших моксифлоксацин, не выявлено случаев артритов и тендинитов. Однако считается, что необходимо продолжать наблюдения для оценки риска артроксичности [69].

### **Влияние на центральную нервную систему (ЦНС)**

Наиболее частыми реакциями ЦНС являются головокружение (3%) [69, 70] и головная боль (2%) [70]. Усталость и бессонница встречаются значительно реже.

### **Влияние на микрофлору носоглотки и кишечника**

Моксифлоксацин существенно не влияет на микрофлору носоглотки и кишечника: после окончания приема препарата за короткий период ее состав нормализуется [77, 78].

### **Лекарственные взаимодействия**

Одновременный прием пищи, включая молочные продукты, и кальцийсодержащих препаратов не влияет на всасывание моксифлоксацина [42, 43, 79]. Железосодержащие препараты, антацид «Маалокс» (алюминия гидроксид + магния гидроксид), сукральфат (1 г однократно) при одновременном приеме с моксифлоксацином приводят к уменьшению его всасывания [80, 81, 82]. В связи с этим моксифлоксацин, как и другие фторхинолоны, не следует принимать одновременно с антацидами, препаратами железа и другими лекарственными средствами, содержащими катионы алюминия, магния, цинка, а также с мультиминеральными добавками.

При необходимости приема катионсодержащих препаратов следует соблюдать 2-часовой интервал до приема моксифлоксацина и 4-часовой после приема.

Не выявлено клинически значимого взаимодей-

ствия при одновременном приеме моксифлоксацина с пероральными контрацептивами (этилэстрадиол – 0,03 мг и левоноргестрел – 0,15 мг) [83], ранитидином (300 мг/сут [81], дигоксином (0,25 мг/сут) [84], теофиллином (800 мг/сут) [85], варфарином (25 мг/сут в течение 17 дней до приема первой дозы моксифлоксацина) [86].

### **Дозы и применение**

Моксифлоксацин назначается взрослым пациентам (в возрасте 18 лет и старше) по 400 мг 1 раз в сутки. Рекомендуемая длительность его приема при внебольничной пневмонии – 10 дней, при обострении хронического бронхита – 5, при остром синусите – 7, при инфекциях кожи и мягких тканей – 7.

Таблетки следует принимать, не разжевывая и запивая небольшим количеством воды. Одновременный прием пищи не влияет на всасывание препарата. Нет необходимости в коррекции дозы при назначении пациентам с легкой почечной недостаточностью – клиренс креатинина выше 30 мл/(мин·1,73 м<sup>2</sup>).

Как и все другие фторхинолоны, моксифлоксацин не рекомендуется принимать детям и подросткам, беременным и женщинам, кормящим грудью.

### **Заключение**

Моксифлоксацин – новый фторхинолон IV поколения, обладающий высокой активностью в отношении грамположительных кокков, включая полирезистентные пневмококки, грамотрицательные бактерии, атипичные возбудители и анаэробы. Благодаря оптимальной фармакокинетики его можно принимать 1 раз в сутки. Препарат хорошо переносится больными, высокоэффективен при лечении инфекций дыхательных путей (острый синусит, обострение хронического бронхита, внебольничная пневмония), инфекций кожи, мягких тканей, органов малого таза. Перспективно применение моксифлоксацина при интраабдоминальных инфекциях.

Отсутствие существенных различий между фармакокинетическими параметрами моксифлоксацина при внутривенном и пероральном введениях в скором будущем позволит применять его в ступенчатой терапии с ранним переходом на прием внутрь.

Фторхинолоны III–IV поколений открыли новый путь терапии инфекций дыхательных путей. Поэтому в современных руководствах по лечению внебольничной пневмонии наряду с  $\beta$ -лактамами и макролидами рекомендуются и новые фторхинолоны, особенно в регионах, где появились полирезистентные пневмококки [87].

При полиэтиологических инфекциях (в гинекологии, абдоминальной хирургии и др.) применение моксифлоксацина позволит обеспечить более удоб-

ную и безопасную монотерапию и, вероятно, сократить затраты на лечение.

## Литература

1. Quintiliani R., Owens R.Jr., Grant E. Clinical role of fluoroquinolones in patients with respiratory tract infections. *Infect Dis Clin Pract* 1999; 8 (Suppl 1):S28-41.
2. Stass H., Dalhoff A., Kubitz D., Schuhly U. Pharmacokinetics, safety, and tolerability of ascending single doses of moxifloxacin, a new 8-methoxyquinolone, administered to healthy subjects. *Antimicrob Agents Chemother* 1998; 42:2060-5.
3. Appelbaum P., Hunter P. The fluoroquinolone antibacterials: past, present and future perspectives. *Int J Antimicrob Agents* 2000; 16:5-15.
4. Ricci V., Piddock L. Characterization of the QRDR of *gyrA* of *Bacteroides fragilis* and role in fluoroquinolone resistance. Proceedings of the 38th ICAAC<sup>6</sup>; 1998 Sep 24-27; San Diego, USA. p. 121.
5. Hooper D. Mechanisms of fluoroquinolone resistance. *Drug Resistance Updates* 1999; 2:38-55.
6. Janoir C., Zeller V., Kitzis M.D., Moreau N.J., Gutmann L. High-level fluoroquinolone resistance in *Streptococcus pneumoniae* requires mutations in *parC* and *gyrA*. *Antimicrob Agents Chemother* 1996; 40: 2760-4.
7. Schmitz F.-J., Fluit A., Scheuring S., et al. Analysis of mechanisms conferring quinolone resistance in *Staphylococcus aureus*. *Clin Microb Infection* 1999; 5 (Suppl 3):102.
8. Schedletzky H., Wiedemann B., Heisig P. The effect of moxifloxacin on its target topoisomerases from *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43 (Suppl B):31-7.
9. Jones M., Staple A., Critchley I., et al. Benchmarking the *in vitro* activities of moxifloxacin and comparator agents against recent respiratory isolates from 377 medical centers throughout the United States. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:2645-52.
10. Blondeau J., Laskowski R., Vaughan D. *In vitro* activity of BAY 12-8039, a novel fluoroquinolone antimicrobial agent. Proceedings of the 37th ICAAC<sup>6</sup>, 1997. Poster F155.
11. Losa E., Morosini M., Almaraz F., Negri M., Baquero F. Comparative *in vitro* activity of moxifloxacin against respiratory tract pathogens. Proceedings of the 38th ICAAC<sup>6</sup>; 1998 Sep 24-27; San Diego, USA. p. 229.
12. Buxbaum A., Straschil U., Moser C., Graninger W., Georgopoulos A. Comparative susceptibility to penicillin and quinolones of 1385 *Streptococcus pneumoniae* isolates. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43 (Suppl B): 13-8.
13. Sidorenko S., Grudinina S., Kotosova L. Antimicrobial resistance of *Streptococcus pneumoniae* recovered from respiratory tract infections (RTI) of inpatients in Moscow. Proceedings of the 40th ICAAC<sup>6</sup>; 2000 Sep 17-20; Toronto, Canada. p. 109.
14. Johnson A., Livermore D., Warner M., James D., George R. Activity of moxifloxacin against invasive and multiresistant pneumococci from England and Wales. Proceedings of the 39th ICAAC<sup>6</sup>; 1999 Sep 26-29; San Francisco, USA. p. 255.
15. Milatovic D., Schmitz F., Brisse S., Verhoef J., Fluit A. *In vitro* activities of sitafloxacin (DU-6859a) and six other fluoroquinolones against 8,796 clinical bacterial isolates. *Antimicrob Agents Chemother* 2000; 44:1102-7.
16. Souli M., Weneersten C., Eliopoulos G. *In vitro* activity of BAY 12-8039, a novel 8-methoxyquinolone, against species representative of respiratory tract infections. Proceedings of the 37th ICAAC<sup>6</sup>, 1997. Poster F126.
17. Blondeau J., Church D., Laskowski R., Borsos S. Comparative activity of moxifloxacin and other quinolones against macrolide sensitive and resistant *Streptococcus pyogenes*. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44 (Suppl A):131.
18. Jones M., Visser M., Klootwijk M., Heisig P., Verhoef J., Schmitz F. Comparative activities of clinafloxacin, grepafloxacin, levofloxacin, moxifloxacin, ofloxacin, sparfloxacin, and trovafloxacin and nonquinolones linozelid, quinupristin-dalfopristin, gentamicin, and vancomycin against clinical isolates of ciprofloxacin-resistant and -susceptible *Staphylococcus aureus* strains. *Antimicrob Agents Chemother* 1999; 43:421-3.
19. Kretchikov V.A., Dekhnich A.V., Pylayeva S.I., Kochetkov G.A., Kozlov R.S. Activity of old and new fluoroquinolones against nosocomial methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from a trauma hospital. *Int J Antimicrob Agents* 2001; 17 (Suppl 1): S147.
20. Fass R. *In vitro* activity of BAY 12-8039, a new 8-methoxyquinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:1818-24.
21. Woodcock J., Andrews J., Boswell F., Brenwald N., Wise R. *In vitro* activity of BAY 12-8039, a new fluoroquinolone. *Antimicrob Agents Chemother* 1997; 41:101-6.
22. Кречиков В., Эйдельштейн И. Активность левофлоксацина и моксифлоксацина в отношении ципрофлоксациннеустойчивых нозокомиальных штаммов продуцентов  $\beta$ -лактамаз расширенного спектра (ESBL). *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2001; 3 (Прил 1): 23.
23. Roblin P., Kutlin A., Reznik T., Hammerschlag M. Activity of grepafloxacin and other fluoroquinolones and newer macrolides against recent clinical isolates of *Chlamydia pneumoniae*. *Int J Antimicrob Agents* 1999; 12:181-4.
24. Donati M., Rodriguez Fermepin M., Olmo A., D'Apote L., Cevenini R. Comparative *in vitro* activity of moxifloxacin, minocycline and azithromycin against *Chlamydia* spp. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43:825-7.

<sup>6</sup> Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy.



25. Roblin P., Hammerschlag M. *In vitro* activity of a new 8-methoxyquinolone, BAY 12-8039, against *Chlamydia pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42:951-2.
26. Samra Z., Rosenberg S., Soffer Y., Dan M. *In vitro* susceptibility of recent clinical isolates of *Chlamydia trachomatis* to macrolides and tetracyclines. Diagn Microbiol Infect Dis 2001; 39:177-9.
27. Duffy L., Kempf M., Crabb D., Wall W., Herrington J. *In vitro* activity of moxifloxacin and six other new antimicrobials against *Mycoplasma pneumoniae*. Proceedings of the 39th ICAAC<sup>6</sup>; 1999 Sep 26–29; San Francisco, USA. p. 252.
28. Bebear C.M., Renaudin H., Boudjadja A., Bebear C. *In vitro* activity of BAY 12-8039, a new fluoroquinolone against mycoplasmas. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42:703-4.
29. Takahata M., Shimakura M., Hori R., et al. *In vitro* and *in vivo* efficacies of T-3811ME (BMS-284756) against *Mycoplasma pneumoniae*. Antimicrob Agents Chemother 2001; 45:312-5.
30. Ullmann U., Schubert S., Krausse R. Comparative *in vitro* activity of levofloxacin, other fluoroquinolones, doxycycline and erythromycin against *Ureaplasma urealyticum* and *Mycoplasma hominis*. J Antimicrob Chemother 1999; 43 (Suppl C):33-6.
31. Schulin T., Wennersten C., Ferraro M., Moellering R. Jr., Eliopoulos G. Susceptibilities of *Legionella* spp. to newer antimicrobials *in vitro*. Antimicrob Agents Chemother 1998; 42:1520-3.
32. Gomez-Lus R., Adrian F., del Campo R., et al. Comparative *in vitro* bacteriostatic and bactericidal activity of trovafloxacin, levofloxacin and moxifloxacin against clinical and environmental isolates of *Legionella* spp. Int J Antimicrob Agents 2001; 18:49-54.
33. Gillespie S., Billington O. Activity of BAY 12-8039 against mycobacteria. Proceedings of the 8th ICID<sup>9</sup>; 1998 May 15–18; Boston, USA. p. 176.
34. Rivera-Martinez E., Pórez-González E., García M., Orrantia-Gradón R., Hernández-Oliva G., Torres-Gutierrez Rubro A. Determination of the *in vitro* susceptibility of different strains of *M. tuberculosis* to BAY 12-8039 and other antituberculosis agents. Proceedings of the 8th ICID<sup>7</sup>; 1998 May 15–18; Boston, USA. p. 173-4.
35. Nord C., Edlund C. Susceptibility of anaerobic bacteria to BAY 12-8039, a new methoxyquinolone. Clin Microb Infection 1997; 3 (Suppl 2):285.
36. MacGowan A., Bowker K., Holt H., Wootton M., Reeves D. BAY 12-8039, a new 8-methoxyquinolone: comparative *in vitro* activity with nine other antimicrobials against anaerobic bacteria. J Antimicrob Chemother 1997; 40:503-9.
37. Boswell F., Andrews J., Wise R., Dalhoff A. Bactericidal properties of moxifloxacin and post-antibiotic effect. J Antimicrob Chemother 1999; 43 (Suppl B):43-9.
38. Stass H., Kubitz D. Pharmacokinetics and elimination of moxifloxacin after oral and intravenous administration in man. J Antimicrob Chemother 1999; 43 (Suppl B):83-90.
39. Ballou C., Lettieri J., Agarwal V., Liu P., Stass H., Sullivan J. Absolute bioavailability of moxifloxacin. Clin. Ther 1999; 21:513-22.
40. Wise R., Andrews J., Marshall G., Hartman G. Pharmacokinetics and inflammatory-fluid penetration of moxifloxacin following oral or intravenous administration. Antimicrob Agents Chemother 1999; 43:1508-10.
41. Lubasch A., Keller I., Borner K., Koeppe P., Lode H. Comparative pharmacokinetics of ciprofloxacin, gatifloxacin, grepafloxacin, levofloxacin, trovafloxacin and moxifloxacin after single oral administration in healthy volunteers. Antimicrob Agents Chemother 2000; 44:2600-3.
42. Lettieri J., Vargas R., Agarwal V., Liu P. Effect of food on the pharmacokinetics of a single oral dose of moxifloxacin 400 mg in healthy male volunteers. Clin Pharmacokinet 2001; 40 (Suppl 1):19-25.
43. Stass H., Kubitz D. Effects of dairy products on the oral bioavailability of moxifloxacin, a novel 8-methoxyfluoroquinolone, in healthy volunteers. Clin Pharmacokinet 2001; 40 (Suppl 1):33-8.
44. Gehanno P., Stass H., Arvis P. Penetration of moxifloxacin (MXF) into sinus tissues following multiple oral dosing. Clin Microb Infection 1999; 5 (Suppl 3):138.
45. Soman A., Honeybourne D., Andrews J., Jevons G., Wise R. Concentrations of moxifloxacin in cerum and pulmonary compartments following a single 400 mg oral dose in patients undergoing fibre-optic bronchoscopy. J Antimicrob Chemother 1999; 44:835-8.
46. Sullivan J., Lettieri J., Liu P., Heller A. The influence of age and gender on the pharmacokinetics of moxifloxacin. Clin Pharmacokinet 2001; 40 (Suppl 1):11-8.
47. Stass H., Halabi A., Delesen H. No dose adjustment needed for patients with renal impairment receiving oral BAY 12-8039 (M). Proceedings of the 38th ICAAC<sup>8</sup>; 1998 Sep 24–27; San Diego, USA. p. 5.
48. Stass H., Kubitz D. No dose adjustment is needed for moxifloxacin (MOX) in subjects suffering from hepatic impairment (HI). Clin Microb Infection 1999; 5 (Suppl 3):291.
49. Zhanel G., Walters M., Karlowsky J., Laing N., Hoban D. Activity of free (unbound) fluoroquinolone serum concentrations versus multi-drug resistant *Streptococcus pneumoniae* using an *in vitro* pharmacodynamic model. Proceedings of the 40th ICAAC<sup>6</sup>; 2000 Sept 17–20; Toronto, Canada. p. 7.
50. Wright D., Brown G., Peterson M., Rotschafer J. Application of fluoroquinolones pharmacodynamics. J Antimicrob Chemother 2000; 46:669-83.
51. Murray B. The growing threat of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*. Infect Dis Clin Pract 1997; 6:S21-S27.
52. Fogarty C., Grossman C., Williams J., Haverstock D., Church D. Efficacy and safety of moxifloxacin vs clarithromycin for community-acquired pneumonia. Infect Med 1999; 16:748-63.

<sup>7</sup> International Congress on Infectious Diseases.

53. Hoffken G., Meyer H., Sprenger K., Verhoef L. Efficacy and safety of moxifloxacin (MXF) vs clarithromycin (Clarithro) for the treatment of community-acquired pneumonia (CAP). *J Antimicrob Chemother* 1999; 44 (Suppl A):127.
54. Petipretz P., Arvis P., Marel M., et al. Oral moxifloxacin versus high-dosage amoxicillin in the treatment of mild-to-moderate, community-acquired, suspected pneumococcal pneumonia in adults. *Chest* 2001; 119:185-95.
55. Krasemann C., Meyer J., Springsklee M. Moxifloxacin (MXF) in community-acquired pneumonia (CAP) – a bacteriologic and clinical meta-analysis. *Clin Microb Infection* 1999; 5 (Suppl 3):139.
56. Chodosh S., DeAvate C., Haverstock D., Aneiro L., Church D. Short-course moxifloxacin therapy for treatment of acute bacterial exacerbations of chronic bronchitis. *Resp Med* 2000; 94:18-27.
57. Wilson R., Kubin R., Ballin I., et al. Five day moxifloxacin therapy compared with 7 day clarithromycin therapy for the treatment of acute exacerbations of chronic bronchitis. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44:501-13.
58. Schaberg T. Comparative effect of moxifloxacin and co-amoxiclav in the treatment of AECB. *Clin Microb Infection* 2000; 6 (Suppl 1):135.
59. Kreis S., Herrera N., Golzar N., et al. A comparison of moxifloxacin and azithromycin in the treatment of acute exacerbations of chronic bronchitis. *J Clin Outcomes Management* 2000; 7: 33-7.
60. DeAbate C., Mathew C., Warner J., Heyd A., Church D. The safety and efficacy of short course (5-day) moxifloxacin vs azithromycin in the treatment of patients with acute exacerbation of chronic bronchitis. *Respir Med* 2000; 94: 1029-37.
61. Krasemann C., Meyer J., Springsklee M. Moxifloxacin (MXF) in acute exacerbations of chronic bronchitis (AECB) – a bacteriologic and clinical meta-analysis. *Clin Microb Infection* 1999; 5 (Suppl 3):139.
62. Burke T., Villanueva C., Mariano H. Jr., et al. Comparison of moxifloxacin and cefuroxime axetil in the treatment of acute maxillary sinusitis. *Clin Ther* 1999; 21:1664-77.
63. Siegert R., Gehanno P., Nikolaidis P., et al. A comparison of the safety and efficacy of moxifloxacin (BAY 12-8039) and cefuroxime axetil in the treatment of acute bacterial sinusitis in adults. *Respir Med* 2000; 94:337-44.
64. Krasemann C., Meyer J., Springsklee M. Moxifloxacin (MXF) in acute sinusitis (AS) – a bacteriologic and clinical meta-analysis. *Clin Microb Infection* 1999; 5 (Suppl 3):139.
65. Parish L., Heyd A., Haverstock D., Church D. Efficacy and safety of moxifloxacin versus cephalexin in the treatment of mild to moderate acute uncomplicated skin and skin structure infections. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44 (Suppl A):137.
66. Leal del Rosal P., Martinez R., Fabian G., et al. Efficacy and safety of moxifloxacin vs cephalexin in the treatment of mild to moderate uncomplicated skin and soft tissue infections (uSSSI). *J Antimicrob Chemother* 1999; 44 (Suppl A):148.
67. Leal del Rosal P., Fabian G., Vick-Fragoso R. Efficacy and safety of moxifloxacin vs cephalexin (with or without metronidazole) in the treatment of mild to moderate uncomplicated skin and skin structures infections (uSSSI). *Proceedings of the 39th ICAAC<sup>6</sup>*; 1999 Sep 26–29; San Francisco, USA. p. 716.
68. Heystek M., Tellarini M., Schmitz H., Krasemann C. Efficacy and safety of moxifloxacin (Мокси) vs ciprofloxacin plus doxycycline plus metronidazole for the treatment of uncomplicated pelvic inflammatory disease (PID). *J Antimicrob Chemother* 1999; 44 (Suppl A):143.
69. Kubin R., Reiter C. Safety update of moxifloxacin: a current review of clinical trials and post-marketing observational studies. *Proceedings of the 40th ICAAC<sup>6</sup>*; 2000 Sep 17–20; Toronto, Canada. p. 477.
70. Springsklee M., Reiter C., Meyer J. Safety and Tolerability Profile of Moxifloxacin (MXF). *Clin Microb Infection* 1999; 5 (Suppl 3):140.
71. Vohr H., Wasinka-Kempka G., Ahr H. Studies on the Phototoxic Potential of a new 8-Methoxyquinolone: BAY 12-8039. *Proceedings of the 36th ICAAC<sup>6</sup>*; 1996 Sep 15–18; New Orleans, USA. p. 103.
72. Man I., Murphy J., Ferguson J. Fluoroquinolone phototoxicity: a comparison of moxifloxacin and lomefloxacin in normal volunteers. *J Antimicrob Chemother* 1999; 43 (Suppl B):77-82.
73. Ferguson J., Alajmi H., Kubin R., Dagget S., Saggu P. A double-blind, placebo- and lomefloxacin-controlled human volunteer phototest study to determine the photosensitising potential of oral moxifloxacin (BAY 12-8039). *Proceedings of the 8th ICID<sup>7</sup>*; 1998 May 15–18; Boston, USA. p.197.
74. Siepmann M., Kirch W. Tachycardia associated with moxifloxacin. *BMJ* 2001; 322:23.
75. Kubitzka D., Delesen H. Influence of oral moxifloxacin on the QTs interval of healthy volunteers. *Proceedings of the 40th ICAAC<sup>6</sup>*; 2000 Sep 17–20; Toronto, Canada. p. 475.
76. Hollister A., Haverstock D., Choudhri S. Moxifloxacin has a favorable cardiovascular safety profile in patients taking concomitant QTs prolonging drugs. *Proceedings of the 40th ICAAC<sup>6</sup>*; 2000 Sep 17–20; Toronto, Canada. p. 476.
77. Beyer G., Hiemer-Bau M., Ziege S., Edlund C., Lode H., Nord C. Impact of moxifloxacin versus clarithromycin on normal oropharyngeal microflora. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* 2000; 19:548-50.
78. Edlund C., Beyer G., Hiemer-Bau M., Ziege S., Lode H., Nord C. Comparative effects of moxifloxacin and clarithromycin on normal intestinal microflora. *Scand J Infect Dis* 2000; 32:81-5.
79. Stass H., Ochmann K. No significant interaction between oral moxifloxacin (MOX) and calcium supplements (CAS) in healthy volunteers (HV). *J Antimicrob Chemother* 1999; 44 (Suppl A):132.
80. Stass H., Kubitzka D. Effects of iron supplements on the oral bioavailability of moxifloxacin, a novel 8-methoxy-fluoroquinolone, in humans. *Clin Pharmacokinet* 2001; 40 (Suppl 1):57-62.

81. Stass H., Boettcher M., Ochmann K. Evaluation of the influence of antacids and H<sub>2</sub> antagonists on the absorption of moxifloxacin after oral administration of a 400 mg dose to healthy volunteers. *Clin Pharmacokinet* 2001; 40 (Suppl 1):39-48.
82. Stass H., Schuhly U., Wandel C., et al. Study to evaluate the interaction between oral moxifloxacin and sucralfate in healthy volunteers. *Proceedings of the 39th ICAAC*<sup>6</sup>. 1999 Sep 26–29. San Francisco, USA. p. 2.
83. Sachse R., Stass H., Delesen H., et al. Lack of interaction between moxifloxacin and combined oral contraceptive steroids. *Clin Microb Infection* 1999; 5 (Suppl 3):141.
84. Stass H., Frey R., Kubitz D., Moller J.-G., Zuhlsdorf M. Influence of orally administered moxifloxacin (MOX) on the steady pharmacokinetics (PK) of digoxin (D) in healthy mail volunteers. *J Antimicrob Chemother* 1999; 44 (Suppl A):134.
85. Stass H., Kubitz D. Lack of pharmacokinetic interaction between moxifloxacin, a novel 8-methoxyfluoroquinolone, and theophylline. *Clin Pharmacokinet* 2001; 40 (Suppl 1):63-70.
86. Muller F., Hundt H., Muir A., et al. Study of the influence of once-daily 400 mg BAY 12-8039 (M) given once daily to healthy volunteers on PK and PD of warfarin (W). *Proceedings of the 38th ICAAC*<sup>6</sup>; 1998 Sep 24–27; San Diego, USA. p. 4.
87. Синопальников А., Страчунский Л. Новые рекомендации по ведению взрослых пациентов с внебольничной пневмонией. *Клин микробиол антимикроб химиотер* 2001; 3(1): 54-68.

УДК 615.33.035:617

## Профилактическое применение антибиотиков в хирургии

Э.П. Деллинджер

Отделение общей хирургии Вашингтонского университета, Вашингтон, США

### Prophylactic Antibiotics in Surgery

E.P. Dellinger

Department of Surgery, Division of Surgery, University of Washington, USA

Открытие в XX веке антибиотиков дало надежду на ликвидацию тяжелых инфекций в хирургии. Однако не только растущее число нозокомиальных инфекций, но и широкое применение антибактериальной терапии часто затрудняют проведение профилактики и контроля хирургических инфекций.

В настоящее время наблюдается увеличение частоты тяжелых хирургических инфекций, что обусловлено разнообразными причинами, в том числе более сложными и длительными операциями, старшим возрастом пациентов, новыми процедурами и хирургическими материалами, увеличением количества операций по пересадке органов, а также более инвазивными диагностическими и лечебными вмешательствами.

Хирургическая раневая инфекция развивается в тех случаях, когда микробная обсемененность раны и вирулентность возбудителя достаточно велики, чтобы подавить местные защитные механизмы макроорганизма и начать прогрессирующий рост и размножение. Риск развития инфекции зависит от свойств микроорганизма, состояния раны, а также от состояния здоровья и уровня иммунитета пациента.

Для предотвращения раневых инфекций следу-

ет избегать микробной контаминации. В этих целях важно обеспечить оптимальный уход в предоперационный период, не сбривать волосы в области операционного поля, а в случае необходимости делать это непосредственно перед операцией, используя эффективные методы обработки кожи. Интраоперационная контаминация значительно зависит от техники хирургического вмешательства, организации проведения самой операции и действий членов операционной бригады.

Только после учета всех перечисленных факторов хирургу следует принять решение о необходимости профилактического назначения антибиотиков с целью снижения частоты хирургической инфекции (табл. 1).

Системное применение антимикробных препаратов с профилактической целью остается предметом споров, что прежде всего обусловлено недостаточным пониманием основных принципов *антибиотикопрофилактики* (АБП) в хирургии (табл. 2). Опыт показывает, что для обеспечения ее эффективности антибиотики должны назначаться согласно принципам *доказательной медицины*. Следствием игнорирования этих принципов является развитие инфекции. Очевидно, что антимикробные препараты могут предотвращать развитие раневой инфекции только в случае контаминации раны чувствительными к ним микроорганизмами. При этом каждый раз необходимо взвешивать возможные преимущества применения антибиотика и риск развития нежелательных реакций.

Необходимо препятствовать беспорядочному применению антибиотиков, так как это приводит к появлению антибиотикорезистентных штаммов микроорганизмов. Длительное использование

---

Контактный адрес:

Evan Patchen Dellinger  
Department of Surgery,  
University of Washington,  
Box 356410, Room BB 428  
1959 N.E. Pacific Street  
Seattle, Washington 981-95-64-10, USA  
Тел.: 206-543-36-82  
Факс: 206-543-81-36  
Эл. почта: patch@washington.edu

Таблица 1. Вопросы, на которые необходимо ответить перед проведением антибиотикопрофилактики

1. В каких случаях следует проводить антибиотикопрофилактику?
2. Какие препараты следует использовать?
3. Когда необходимо начинать введение антибиотиков?
4. Сколько препаратов необходимо назначить?
5. Какова должна быть продолжительность антибиотикопрофилактики?

Таблица 2. Основные принципы антибиотикопрофилактики в хирургии

1. Избирательное применение антибиотиков для профилактики
2. Предполагаются ли бактериоды?
  - «Да» – использовать цефотетан или амоксициллин/клавуланат
  - «Нет» – использовать цефазолин или цефуроксим
3. Антибиотик следует вводить внутривенно непосредственно перед операцией
4. У пациентов с большой массой тела использовать более высокие дозы препаратов
5. При длительных операциях рекомендуется повторное введение антибиотика
6. Не применять антибиотики с целью профилактики после завершения операции

антибиотиков с целью профилактики может маскировать симптомы инфекции, затрудняя установление точного диагноза.

АБП не показана у подавляющего большинства пациентов, подвергающихся «чистым» операциям без очевидной контаминации и при отсутствии инородных тел. Если частота раневых инфекций составляет менее 1%, то антибиотики уже не имеют большого значения в улучшении данного показателя. АБП не может заменить тщательно выполненное с соблюдением основных принципов хирургии хирургическое вмешательство, а их бесконтрольное и нерациональное применение является не лучшей альтернативой для пациента. Антибактериальные препараты могут быть использованы только как дополнение к адекватно проведенному хирургическому вмешательству.

В некоторых клинических ситуациях системное назначение антибиотиков с профилактической целью имеет свои преимущества. В целом почти для всех этих ситуаций характерен непродолжительный период контаминации микроорганизмами. Системная АБП демонстрирует явные клинические преимущества за счет снижения риска развития инфекции в следующих случаях [1].

1. Оперативные вмешательства на органах желудочно-кишечного тракта с высокой степенью риска развития инфекции. Они включают операции по поводу рака желудка, язвенной болезни, кишечной непроходимости или желудочно-кишечного кровотечения, операции, при которых достигается подавление продукции соляной кислоты в желудке, а также операции на желудке по поводу патологического ожирения.

2. Хирургические вмешательства на желчевыводящих путях с высокой степенью риска развития инфекции, включающие операции: у пациентов в возрасте старше 60 лет, при остром воспалительном процессе, удаление камней из общего желчного протока, по поводу механической желтухи, а также у пациентов, которым ранее проводились хирургические или эндоскопические вмешательства на желчных путях.

3. Резекция и наложение анастомозов толстой или тонкой кишки.

4. Кардиохирургические операции, при которых в качестве доступа используется срединная стернотомия.

5. Операции на сосудах нижних конечностей и брюшной аорте.

6. Ампутация конечности с нарушенным кровоснабжением, особенно при ишемических язвах.

7. Гистерэктомия.

8. Провизорное кесарево сечение.

9. Операции на ротоглотке с использованием доступа через мягкие ткани шеи.

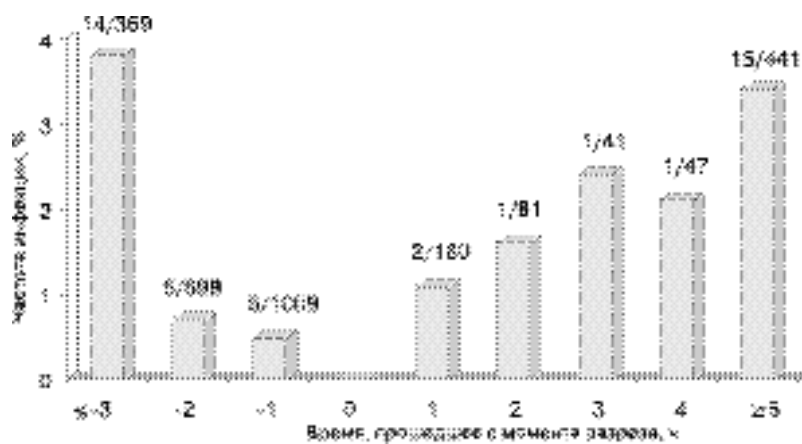
10. Трепанация черепа.

11. Имплантация любых долговременных протезных материалов.

12. Любые раны с установленной массивной бактериальной контаминацией.

13. Травматические повреждения с массивной контаминацией и обширным повреждением тканей. В данной ситуации антибиотик следует вводить внутривенно и как можно быстрее от момента повреждения. Лучшее применение антибиотиков изучено при проникающих ранениях брюшной полости и открытых переломах.





**Рис. 1.** Связь между сроками введения антибиотиков при проведении периоперационной антибиотикопрофилактики и частотой послеоперационных инфекций (по Classen. N Engl J Med 1992;38:281)

14. Повреждения, опасные развитием кластридиальной инфекции вследствие обширного некроза мышц, массивной контаминации и/или нарушения кровоснабжения тканей.

15. Предшествующее поражение клапанов сердца (для предупреждения развития инфекционного эндокардита).

Остается спорным вопрос об АБП при «чистых» операциях, не связанных с имплантацией протезных материалов. В одном хорошо организованном клиническом исследовании у больных, оперированных на органах грудной полости и по поводу грыжи и получавших с профилактической целью антибиотики, риск развития инфекции был ниже, чем у пациентов, получавших плацебо [2]. Тем не менее не везде эти хирургические вмешательства рассматриваются в качестве обоснованных показаний для АБП.

Некоторые специалисты предлагают считать показаниями для АБП только «чистые» операции I и выше степени риска по шкале NNIS и операции у пациентов с четко установленными дополнительными факторами риска развития инфекции [3].

Периоперационная АБП гораздо более эффективна в тех случаях, когда она начинается до операции и продолжается интраоперационно с целью поддержания терапевтической концентрации антибактериального препарата в крови на протяжении всей операции. Это позволяет достигнуть терапевтических концентраций антибиотика в любых гематомах, которые могут образоваться в области операционного поля. Введение антибиотиков, начатое спустя 1–2 ч после бактериальной контаминации, значительно менее эффективно, и совершенно бессмысленно начинать АБП после ушивания раны.

Неудачи, возникающие при АБП, отчасти связаны с игнорированием таких решающих факторов,

как сроки введения препарата и его доза (рис. 1).

У большинства пациентов первая доза антибиотика должна вводиться внутривенно во время вводного наркоза. Неоправданно введение антибиотиков ранее чем за 1 ч до операции, а также назначение их уже после операции. В зависимости от используемого препарата и длительности операции часто бывает достаточно введения всего одной дозы антибиотика.

При более продолжительных операциях выбранный антибактериальный препарат должен вводиться повторно с интервалами, равными 1 или 2 периодам его полувыведения. При плановых операциях практически никогда не показано введение антибиотиков с целью профилактики в течение более 12 ч. Во всех сравнительных исследованиях короткие профилактические курсы антибиотиков продемонстрировали такую же эффективность, как и более длительные.

Многие пациенты не получают показанную им АБП из-за сложности системы назначения препаратов перед трудоемкими операциями, требующими проведения большого количества подготовительных мероприятий. Эта проблема стала еще сложнее в связи с появившейся тенденцией поступления пациентов для плановых вмешательств непосредственно в операционную, что еще больше усложняет выполнение большого количества необходимых процедур за короткое время перед операцией.

Вероятность того, что АБП будет случайно не выполнена, может быть сведена к минимуму путем введения системы контрольных операционных листов. Один из членов операционной бригады (обычно медицинская сестра, проводящая предоперационную подготовку, или член анестезиологической бригады) несет ответственность за заполнение первой части операционной карты, в которой указывается о проведении пациенту показанной ему АБП или решение хирурга о том, что антибиотики при данной операции не показаны [1].

Многие антибиотики при соответствующем их применении и соблюдении показаний эффективно снижают частоту развития хирургических инфекций в послеоперационный период. Нет ни одного антибиотика, который бы отчетливо превосходил все остальные, поскольку каждый из препаратов обладает соответствующим и в то же время сходным спектром антимикробной активности.

Важнейший фактор – знание того, будет ли во время предстоящей плановой операции осуществлен доступ к тем участкам организма, которые достоверно колонизированы облигатными анаэробами (*Bacteroides* spp.). Если предполагается наличие анаэробной микрофлоры, например при операциях на толстой кишке, дистальных отделах подвздошной кишки или при аппендэктомии, то следует применять антибактериальные препараты, эффективные в отношении *Bacteroides* spp., такие, как цефотетан (1–2 г внутривенно в операционной). Альтернативой являются цефокситин или один из ингибиторозащищенных пенициллинов (например, амоксициллин/клавуланат 1,2–2,4 г внутривенно в операционной, повторное введение во время операции с интервалом в 4–5 ч).

Если анаэробная микрофлора не предполагается, то препаратами выбора для периоперационной АБП являются цефазолин или другие цефалоспорины I поколения (1–2 г внутривенно в операционной, повторное введение во время операции с интервалом в 3–4 ч). Цефазолин рекомендован в силу его более длительного периода полувыведения. У пациентов с аллергическими реакциями на цефалоспорины и клиндамицин, а также в стационарах, в которых распространены метициллинорезистентные штаммы *S. aureus*, может быть использован ванкомицин.

Тем не менее использование ванкомицина в целях профилактики должно быть сведено к минимуму, чтобы уменьшить селективное давление, способствующее появлению ванкомицинорезистентных энтеро- и стафилококков. При плановых операциях на тонкой кишке также следует использовать антибиотики, активные в отношении грамотрицательной микрофлоры, а также анаэробов.

Местное использование антибиотиков во многих случаях снижает частоту инфекции при контаминированных ранах. Однако комбинация местного и системного применения антибактериальных препаратов не более эффективна, чем только системная АБП, и в то же время изолированное местное применение антибиотиков значительно уступает системному.

В целом местное применение антибиотиков с профилактической целью не причиняет вреда при соблюдении следующих правил:

- 1) не применять местно в ране или брюшной полости антибиотики, которые не были бы показаны для парентерального применения в данной ситуации;
- 2) не применять местно больше антибиотиков, чем это было бы необходимо при их парентеральном введении в данной ситуации.

АБП, как правило, неэффективна в тех клинических ситуациях, когда сохраняются условия для длительной контаминации микроорганизмами:

- 1) у пациентов с трахеостомой или интубированных (для профилактики инфекций дыхательных путей);
- 2) у больных с постоянным мочевым катетером;
- 3) у пациентов с центральными венозными катетерами или дренажами плевральной полости;
- 4) у большинства пациентов с открытыми ранами, в том числе и ожоговыми.

### **Послеоперационная лихорадка**

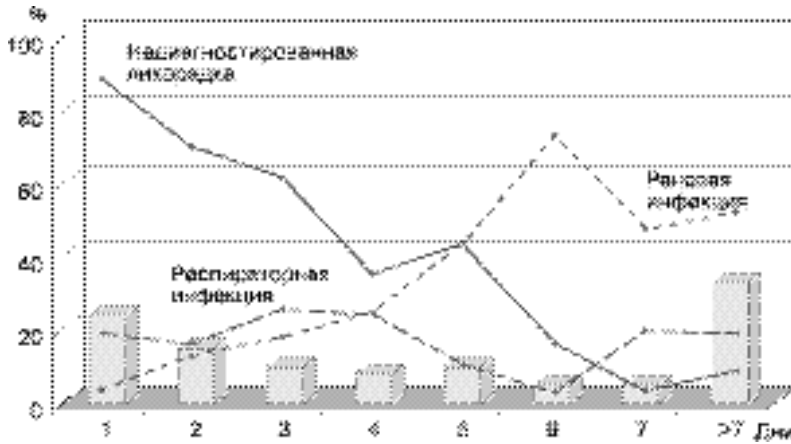
Около 2% всех первичных лапаротомий сопровождаются незапланированными операциями по поводу интраабдоминальной инфекции, а приблизительно 50% всех серьезных интраабдоминальных инфекций возникают в послеоперационный период [4].

Раневые инфекции (поверхностные хирургические) – наиболее распространенное, но менее серьезное проявление хирургической инфекции. Лихорадка после хирургических вмешательств встречается довольно часто и может служить причиной беспокойства врачей и пациентов. Она ассоциируется с инфекцией, и в связи с этим наиболее распространенной тактикой врача в ответ на ее возникновение является назначение эмпирической антибактериальной терапии.

Тем не менее большинство пациентов, лихорадящих в послеоперационный период, не имеют инфекции. Более того, у значительной части пациентов с инфекцией может не быть лихорадки, что зависит от используемых критериев определения понятия «лихорадка». Так как лихорадка часто наблюдается и при отсутствии инфекции, важно рассмотреть все другие неинфекционные причины послеоперационной лихорадки и поставить предварительный диагноз еще до начала антибактериальной терапии [5].

Наиболее распространенные нехирургические причины инфекции и лихорадки в послеоперационный период, такие, как инфекции мочевыводящих и дыхательных путей, а также инфекции, связанные с использованием венозных катетеров, диагностируются без особого труда. Другие не менее важные причины, такие, как раневая и интраабдоминальная инфекции, требуют оперативного вмешательства и не могут быть эффективно устранены только с помощью антибактериальной терапии без адекватного хирургического лечения.

Наиболее чувствительным методом выявления инфекции и определения ее локализации продолжают оставаться тщательный сбор анамнеза и фи-



**Рис. 2.** Частота лихорадки различного происхождения в зависимости от срока, прошедшего с момента операции, %

зическое исследование, проводимые добросовестным врачом. Специалистом, лучше всего понимающим течение заболевания у пациента в послеоперационный период, является оперирующий хирург. Лабораторное и рентгенологическое исследования, включая определение количества лейкоцитов, выделение гемокультуры, компьютерную томогра-

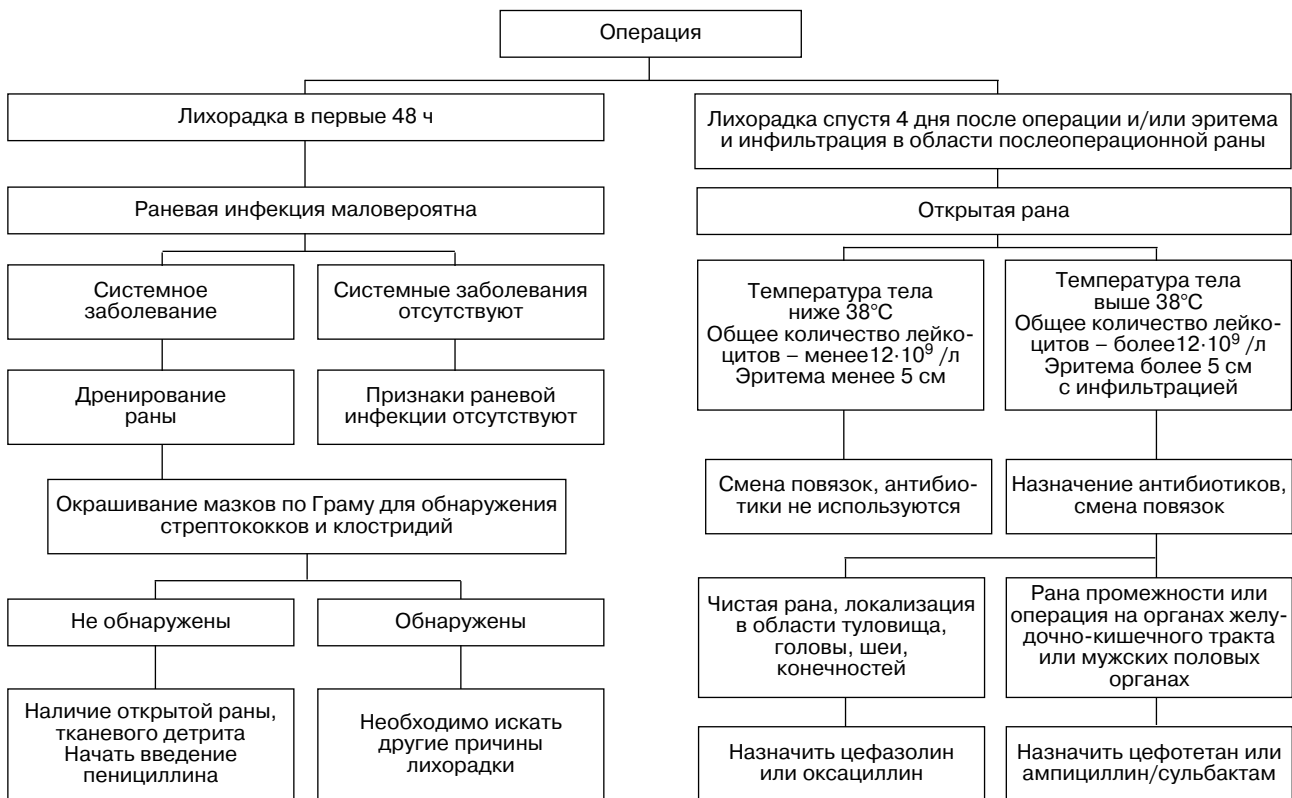
фию или ультразвуковое исследование, могут дополнять физическое обследование пациента.

Лихорадка в первые 3 сут после операции обычно имеет неинфекционную природу. В то же время, когда она начинается спустя 5 и более дней после операции, частота раневой инфекции превышает частоту недиагностированных лихорадок (рис. 2).

Ни увеличение продолжительности периоперационной АБП, ни назначение эмпирической антибактериальной терапии не показаны при отсутствии предварительного клинического диагноза, а при необходимости – плана оперативного лечения (рис. 3).

Существуют всего 2 наиболее важные причины лихорадки, возникающей вследствие инфекций в первые 36 ч после лапаротомии. Обе они могут быть легко диагностированы, если заподозрены и проведено соответствующее обследование.

Первая причина – повреждение кишечника с внутрибрюшным кровотечением. Это состояние ха-



**Рис. 3.** Алгоритм диагностики раневой инфекции

рактируется выраженными гемодинамическими изменениями – вначале тахикардией, а затем гипотензией и снижением диуреза. Отмечается выраженный дефицит жидкости, а при физическом обследовании выявляется разлитая болезненность при пальпации живота.

В т о р а я причина ранней лихорадки – инвазивная инфекция мягких тканей, начинающаяся в области раны, вызываемая  $\beta$ -гемолитическим стрептококком или клостридиальной микрофлорой, чаще всего *Clostridium perfringens*. Она может быть выявлена путем осмотра раны, а также окраской по Граму мазков раневого отделяемого, в которых обнаруживаются грамположительные кокки или палочки.

При стрептококковой инфекции в мазках обычно присутствуют лейкоциты, которых может не быть при развитии клостридиальной инфекции. Редко в качестве причины инфекции в первые 48 ч

после операции может быть раневой токсический шок. Он развивается при контаминации раны некоторыми токсинпродуцирующими штаммами *Staphylococcus aureus*.

Менее 1% всех случаев токсического шока, зарегистрированных *центрами по контролю и профилактике заболеваний* (CDC), были связаны с раневой инфекцией. В половине этих случаев развитие начиналось в первые 48 ч после операции.

Начальные проявления данного состояния представлены лихорадкой, диареей, рвотой, эритемой и гипотензией. В последующем присоединяется десквамация кожи. Объективные признаки раневой инфекции в большинстве зарегистрированных случаев были выражены слабо или отсутствовали. В подобной ситуации рекомендуется дренирование раны и назначение антибиотиков, но в то же время оптимального способа лечения раневого инфекционного шока пока не найдено.

## Л и т е р а т у р а

1. Dellinger E.P., Gross P.A., Barrett T.L., et al. Quality standard for antimicrobial prophylaxis in surgical procedures. *Clin Infect Dis* 1994;18:422-7.
2. Platt R., Zaleznik D.F., Hopkins C.C., et al. Perioperative antibiotic prophylaxis for herniorrhaphy and breast surgery. *N Engl J Med* 1990;322:152-60.
3. Page C.P., Bohnen J.M.A., Fletcher J.R., McManus A.T., Solomkin J.S., Wittman D.H. Antimicrobial prophylaxis for surgical wounds: Guidelines for clinical care. *Arch Surg* 1993;128:79-88.
4. Dellinger E.P. Surgery for intra-abdominal sepsis. In: White T.T., Harrison R.C., Debas H.T., Mulholland M., editors. *Reoperative gastrointestinal surgery*. New York: Appleton, Century, Crofts, 1989. p. 63-73.
5. Dellinger E.P. Approach to the patient with postoperative fever. In: Gorbach S., Bartlett J., Blacklow N., editors. *Infectious diseases in medicine and surgery*. Philadelphia: W.B. Saunders, 1998. p. 903-9.

УДК 579.869.1.083.18

## Новые методы идентификации *Listeria monocytogenes*

Т.И. Карпова<sup>1</sup>, С.А. Ермолаева<sup>1</sup>, И.В. Лопырев<sup>1</sup>, Н.С. Бродина<sup>1</sup>,  
И.С. Тартаковский<sup>1</sup>, Х.А. Васкес-Боланд<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Научно-исследовательский институт эпидемиологии и микробиологии им Н.Ф. Гамалеи РАМН, Москва, Россия

<sup>2</sup> Университет Комплутенсе, Испания

Идентификация *Listeria monocytogenes* в клинических образцах часто затруднена вследствие морфологических и биохимических особенностей возбудителя листериоза. В работе на 66 штаммах листерий сравнивались традиционные биохимические и бактериологические методы идентификации *L. monocytogenes* с полимеразной цепной реакцией (ПЦР) и с оригинальным бактериологическим методом, основанным на сопоставлении лецитиназной активности культуры в присутствии или отсутствии активированного угля. В ПЦР с праймерами, направляющими амплификацию фрагмента гена

*plcA*, выявлена 100% специфичность и высокая чувствительность, свидетельствующие о целесообразности более широкого применения этого метода. У 89% штаммов *L. monocytogenes* обнаружена специфическая индукция лецитиназной активности при добавлении в среду активированного угля. В то же время у всех штаммов листерий, не принадлежавших к *L. monocytogenes*, а также у ряда патогенных бактерий других родов такого феномена не наблюдалось.

**Ключевые слова:** *Listeria monocytogenes*, идентификация, лецитиназная активность, ПЦР.

### New Methods for Identification of *Listeria monocytogenes*

T.I. Karpova<sup>1</sup>, S.A. Ermolaeva<sup>1</sup>, I.V. Lopirev<sup>1</sup>, N.S. Brodinova<sup>1</sup>, I.S. Tartakovskii<sup>1</sup>, J.A. Vazquez-Boland<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Research Institute of Epidemiology and Microbiology Named Under N.F. Gamaleya RAMS, Moscow, Russia

<sup>2</sup> University Complutense, Spain

Identification of *Listeria monocytogenes* in clinical specimens is often complicated because of morphological and biochemical properties of this pathogen. In present article the traditional bacteriological methods of identification of *L. monocytogenes* are compared with PCR and original method of identification based on induction of lecithinase activity in the presence of activated charcoal. In the PCR with specific to the gene *plcA* primers there

was 100% specificity and high sensitivity. At the same time in 89% of *L. monocytogenes* strains the specific induction of lecithinase activity by activated charcoal has been shown, when no such a phenomenon have been observed in non-*monocytogenes* *Listeria* and other bacteria studied.

**Key words:** *Listeria monocytogenes*, identification, lecithinase activity, PCR.

#### Введение

Широко распространенная в природе грамположительная бактерия *Listeria monocytogenes* относит-

ся к числу факультативных внутриклеточных паразитов. Вызываемая ею инфекция, *листериоз*, хотя не является широко распространенной, однако характеризуется тяжестью клинического течения и высокой летальностью (до 30% от числа выявленных случаев) [1, 2].

В последние годы в мире наблюдается значительный рост числа заболевших листериозом, особенно лиц пожилого возраста, на фоне сопутствующих заболеваний или иммуносупрессивной терапии. Большую опасность листерии представляют

Контактный адрес:

Ермолаева Светлана Александровна

НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи, ул. Гамалеи 18, Москва, 123098

Тел: (095) 193-63-71

Факс: (095) 190-74-01

E-mail: sveta@ermolaeva.msk.su



для беременных женщин и новорожденных. Они обуславливают выкидыши, мертворождения, а также развитие пороков плода, менингитов, сепсиса и пневмонии у новорожденных.

Диагностика листериоза нередко бывает затруднена вследствие чрезвычайного разнообразия клинических манифестаций. Чаще всего выявляются поражения центральной нервной системы (менингиты и менингоэнцефалиты), часто – сепсис и эндокардиты (10%). Листерийная инфекция осложняется также развитием остеомиелитов, воспаления суставов и пневмоний.

В Российской Федерации в 1992–1999 гг. зарегистрировано 477 случаев листериоза, из них 119 – в Москве, 120 – в Ивановской области, 71 – в Тульской, 37 – в Волгоградской, меньшее число, чаще всего 2–4 случая – в других областях и республиках [3].

В то же время в США заболеваемость листериозом составила около 1600 случаев в год [4]. В большинстве развитых стран отмечается 4–8 случаев заболеваний листериозом в год на 1 млн населения [2].

По мнению большинства специалистов, низкий уровень выявления больных листериозом в России не отражает истинной картины заболеваемости и во многом объясняется неудовлетворительным качеством лабораторной диагностики этой инфекции и отсутствием эффективной системы санитарно-эпидемиологического надзора за ее распространением [1, 5].

Результаты эпидемиологических исследований в ряде стран показали, что распространение листериоза связано преимущественно с заражением продуктов питания, поскольку сама технология их приготовления нередко чревата опасностью контаминации листериями и их размножения до высоких концентраций [2, 4]. В связи с этим в России в 2001 г. введен в действие гигиенический норматив ГН 2.3.2 Министерства здравоохранения РФ, регламентирующий безопасность продуктов питания в отношении возбудителя листериоза.

На наш взгляд, основная проблема, которую придется решать микробиологическим лабораториям, занимающимся выделением листерий, будет связана с быстрой, эффективной и недорогой дифференциацией *L. monocytogenes* от непатогенных видов, часто выявляемых в пищевых продуктах, а также от морфологически сходных бактерий, которые имеют схожие биохимические характеристики, например способность к гидролизу эскулина – основного селективного компонента, входящего в состав сред для выделения листерий.

Сегодня все большее развитие получают совре-

менные молекулярно-биологические методы мониторинга листерий, такие, как *гибридизация* и *полимеразная цепная реакция* (ПЦР) [1]. Однако для многих практических лабораторий использование этих методов будет связано с материальными затратами и соответствующим обучением специалистов.

Изучение биологии и генетики вирулентности возбудителя листериоза дает возможность совершенствования традиционных бактериологических методов идентификации. Начиная с середины 80-х годов прошлого века, когда количество работ в этом направлении стало лавинообразно увеличиваться, были установлены факторы патогенности листерий, необходимые для проявления их вирулентных свойств.

Один из важных факторов патогенности *L. monocytogenes* – лецитиназа (фосфатидилхолин-специфичная фосфолипаза) [6]. Этот фермент необходим для выживания и размножения листерий в инфекционном процессе. Однако при культивировании на средах, содержащих лецитин, лецитиназная активность у *L. monocytogenes* не определяется или выявляется чрезвычайно слабо [7]. Это связано с негативной регуляцией, которой подвергаются все гены патогенности *L. monocytogenes* [8, 9].

Результаты недавних исследований показали, что негативная регуляция осуществляется путем накопления в среде экстраклеточного продукта, продуцируемого *L. monocytogenes* в ходе роста культуры [10]. Этот продукт, выполняющий функции ауторепрессора, может быть устранен гидрофобным сорбентом, например активированным углем. При этом активируются гены патогенности и соответственно возрастает действие факторов патогенности в среде, в том числе и лецитиназы. Этот феномен использован нами для разработки принципиально нового метода дифференциации *L. monocytogenes* как от непатогенных листерий, так и от бактерий других родов, которые в клиническом материале морфологически напоминают листерии.

## Материал и методы исследования

**Использованные штаммы и среды.** В работе использованы типовые штаммы *Listeria* spp. (табл. 1), и штаммы *Listeria* spp., *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli* из коллекции лаборатории легионеллеза НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН.

Принадлежность всех штаммов к указанным видам подтверждена с помощью соответствующих API тестов (bioMerieux, Франция). В работе использованы среды, перечисленные в табл. 4.

Таблица 1. Типовые штаммы *Listeria spp.*, использованные в исследовании

Штамм	Серогруппа
<i>L. monocytogenes</i>	
CLIP 75936	1/2a
SLCC 2755	1/2b
NCTC 5348	1/2c
NCTC 5105	3a
SLCC 2540	3b
SLCC 2479	3c
NCTC 5214	4a
NCTC 10528	4ab
NCTC 10527	4b
P14	4b
ATCC 19116	4c
ATCC 19118	4c
NCTC 10888	4d
<i>L. ivanovii</i>	
ATCC 19119	
SLCC 2379T	
<i>L. seeligeri</i>	
SLCC 5921	
SLCC 3954	
<i>L. innocua</i>	
ATCC 33090	
<i>L. welshimeri</i>	
SLCC 5334	
<i>L. grayi</i>	
17	

#### Определение ферментативной активности.

Для определения лецитиназной активности среды готовили следующим образом. Перед стерилизацией к агаризованной среде добавляли порошкообразный активированный уголь до концентрации 0,2–1%, как указано в тексте. Желток куриного яйца разводили в 150 мл физиологического раствора и добавляли 5% по объему к стерилизованному и охлажденному до температуры 40–45°C питательному агару. Аналогично готовили агар с добавлением желтка, но без добавления активированного угля. Исследуемые штаммы высевали короткими штрихами. Инкубировали 48 ч при температуре 37°C.

Для определения гемолитической активности использовали колумбийский агар (Columbia Blood Agar Base, HiMedia Lab. Ltd, Индия), в который добавляли 5% крови. Гемолитическую активность определяли после 48 ч инкубации при температуре 37°C.

Ферментацию маннита, рамнозы, раффинозы и D-ксилозы определяли по образованию кислоты в среде Purple Broth Base (HiMedia), содержащей 1% сахара, при температуре 37 °C в течение 7 дней.

Таблица 2. Штаммоспецифическая зависимость индукции лецитиназной активности у *L. monocytogenes* от концентрации активированного угля,  $n=26$

Лецитиназная активность	Частота, $n$ (%)
Выявляется:	
независимо от угля	1 ( $\approx 4$ )
при концентрации угля 0,2% и выше	2 ( $\approx 8$ )
при концентрации угля 0,5% и выше	21 ( $\approx 81$ )
Не выявляется	2 ( $\approx 8$ )

Наличие каталазы определяли по образованию газа при суспендировании изолированной колонии в 3% растворе перекиси водорода на предметном стекле, а подвижность – уколом в 0,35% агар *Listeria Motility Medium* (HiMedia) при температуре 22 °C и 37 °C в течение 48 ч.

**Подготовка образцов и проведение полимеразной цепной реакции (ПЦР).** 100 мкл 12-часовой культуры, выращенной в сердечно-мозговом бульоне (Difco) при температуре 37 °C и шуттелирования с частотой 185 в минуту, осаждали центрифугированием при 12 000 об./мин в течение 3 мин. Ресуспендировали в 500 мкл буфера следующего состава: 10 mM Трис HCl, pH 8,0, 1 mM ЭДТА, 20% раствор сахарозы, содержавшего 20 мг/мл добавленного непосредственно перед употреблением лизоцима (Serva). Инкубировали при температуре 37 °C в течение 18–20 ч.

Затем сферопласты осаждали центрифугированием, как описано выше, ресуспендировали в 500 мкл буфера: 10 mM Трис HCl, pH 8,0, 1 mM ЭДТА, 3% раствор Тритона X-100, включавшего 125 мкг/мл добавленной перед употреблением протеиназы K, и инкубировали в течение 1 ч при температуре 56 °C. Лизаты кипятили в течение 10 мин для инактивации протеиназы K. В ПЦР использовали 1 мкл лизата.

ПЦР проводили с праймерами Plc1: 5'-AGGGGGCCATTTTGTATAAG и Plc2: 5'-ATCGTTGCTGTTTTGCTCGGT в амплификаторе Терцик (ДНК-технология) при температуре отжига праймеров 55°C, как описано нами ранее [11].

#### Результаты исследования

**Характеристика штаммов *Listeria spp.*, использованных в работе.** Всего использовали 66 штаммов листерий, принадлежавших ко всем 6 видам, входящим в настоящее время в род *Listeria*. Видовая принадлежность штаммов подтверждена с помощью API *Listeria* тестов (BioMerieux, Франция).

Исследовали признаки, рекомендуемые в раз-

Таблица 3. Характеристика штаммов *Listeria* spp., использованных в работе, %

Вид, количество изученных штаммов	Каталаза (+)	Подвижны при температуре		Гемолитические	Ферментируют				Положительны в ПЦР*
		22°C	37°C		маннит	рамнозу	раффинозу	ксилозу	
<i>L. monocytogenes</i> , n=26	100	100	0	96	0	100	0	0	100
<i>L. innocua</i> , n=31	100	100	87	0	0	93,5	0	0	0
<i>L. welshimeri</i> , n=4	100	75	0	0	0	75	0	100	0
<i>L. seeligeri</i> , n=2	100	100	0	100	0	0	0	100	0
<i>L. ivanovii</i> , n=2	100	100	0	100	0	0	0	100	0
<i>L. grayi</i> , n=1	100	0	0	0	100	0	0	0	0

\*С праймерами, специфическими для *L. monocytogenes* (см. текст).

личных руководствах для идентификации листерий и определения их видовой принадлежности (табл. 3). Все без исключения штаммы были каталазоположительными (устойчивый признак), что отличает листерии от представителей родов *Lactobacillus* и *Erysipelothrix* [7]. Все штаммы *L. monocytogenes* были подвижны в полужидком агаре при температуре 22°C и неподвижны при 37°C. Гемолиз наблюдался на чашках с кровью у штаммов всех 3 видов, которые являются гемолитическими, – *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*, *L. seeligeri*.

У *L. ivanovii* гемолитическая активность выражена гораздо более ярко, чем у двух других видов, у которых гемолиз был схожим. У одного штамма *L. monocytogenes* гемолитическая активность не выявлялась.

В табл. 3 приведены данные о ферментации 4 сахаров, входящих в цветной ряд API *Listeria* и рекомендованных для внутривидовой дифференциации руководством Комитета по пищевым продуктам и лекарственным средствам (FDA, США) [12]. Согласно полученным результатам, по гидролитической активности в отношении лишь 4 сахаров *L. monocytogenes* практически невозможно дифференцировать от непатогенного вида *L. innocua*.

Штаммы *Listeria* spp. были проверены в ПЦР с видоспецифическими праймерами, направляющими амплификацию фрагмента гена *plcA*, кодирующего необходимую для вирулентности *L. monocytogenes* фосфатидилинозитолспецифичную фосфолипазу [11].

При первоначальном изучении листериозных культур использовали несколько иные условия проведения лизиса клеток, чем указано в материале и методах исследования. Именно время обработки клеток лизоцимом, ферментом, разрушающим бактериальную стенку, было сокращено до 1 ч. Однако ряд штаммов не мог быть лизирован в таких условиях. Это приводило к тому, что штаммы, идентифицированные другими методами как *L. monocyto-*

*genes*, давали в ПЦР отрицательный результат. Увеличение времени обработки лизоцимом до 16–20 ч улучшило лизис плохо лизируемых штаммов.

Ранее мы определили чувствительность используемой системы на препаратах очищенной ДНК [11]. Она составляла 125 фг. Чувствительность ПЦР, проводимой на лизатах, составила 1000 бактериальных клеток в образце (рис. 1). При исследовании выделенных культур среднее число клеток в реакции составляло  $10^5$ . Все штаммы *L. monocytogenes* давали положительный результат в ПЦР. Листерии, принадлежавшие к другим видам, в ПЦР давали отрицательный результат.

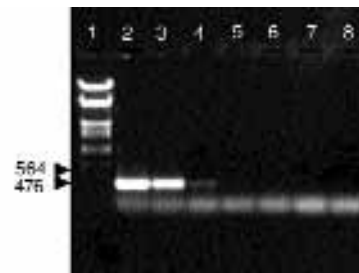


Рис. 1. Определение чувствительности ПЦР с праймерами Plc1, Plc2 на лизатах штамма *L. monocytogenes* NCTC 10527. Стрелками указаны соответствующий фрагмент маркера молекулярной массы (564 нп) и амплифицированный фрагмент (476 нп). 1 – маркер молекулярной массы, ДНК фага лямбда, обработанная рестриктазами EcoRI, Hind III; 2 –  $10^5$  клеток в образце; 3 –  $10^4$  клеток; 4 –  $10^3$  клеток; 5 – 100 клеток; 6 – 10 клеток; 7 – 1 клетка; 8 – отрицательный контроль

**Индукция лецитиназной активности у *L. monocytogenes* в присутствии активированного угля** связана со специфическими регуляторными механизмами, контролирующими экспрессию факторов патогенности. Поэтому она характерна для всех штаммов дикого типа этого вида микроорганизмов.

Таблица 4. Лецитиназная активность *L. monocytogenes* в присутствии 0,5% активированного угля на различных питательных средах

Среда	Лецитиназная активность
Brain Heart Infusion (Difco Lab., США)	+
Brain Heart Infusion (bioMerieux, Франция)	–
Brain Heart Infusion (HiMedia Lab. Ltd, Индия)	–
Listeria Selective Broth (HiMedia Lab. Ltd, Индия)	–
МУР (HiMedia Lab. Ltd, Индия)	–
ГРМ № 1 (ННПГИП, Оболенск, Россия)	+

Таблица 5. Лецитиназная активность *Listeria* spp. при выращивании на среде ГРМ № 1, содержащей и не содержащей активированный уголь

Вид, количество изученных штаммов	Гидролизуют лецитин, %	
	независимо от угля	только в присутствии угля
<i>L. monocytogenes</i> , n = 26	4	89
<i>L. innocua</i> , n = 31	0	0
<i>L. welshimeri</i> , n = 4	0	0
<i>L. seeligeri</i> , n = 2	0	0
<i>L. ivanovii</i> , n = 2	100	0
<i>L. grayi</i> , n = 1	0	0

По данным М.Т. Ripio и соавт. [8], в присутствии 0,2% активированного угля в жидкой сердечно-мозговой среде (Difco) индукция лецитиназной активности наблюдалась у всех 103 исследованных штаммов *L. monocytogenes* дикого типа. Однако мы столкнулись с тем, что поведение штаммов различается при выращивании на агаризованной среде.

Нами проверена индукция лецитиназной активности у 26 штаммов *L. monocytogenes* при выращивании на агаризованной сердечно-мозговой среде (Difco), содержащей желток куриного яйца в качестве источника лецитина, в присутствии от 0,2 до 1% активированного угля. У 20 проверенных штаммов выявлена лецитиназная активность в присутствии 0,5% угля и выше, у 2 штаммов – в присутствии 0,2% и более (табл. 2). Два штамма (SLCC 2540 и NCTC 10528) не обладали лецитиназной активностью в присутствии активированного угля вплоть до 1% и, видимо, вообще не активировались. Один штамм (NCTC 5105) демонстрировал лецитиназную активность как в присутствии, так и при отсутствии активированного угля. Согласно полученным результатам, оптимальной для наблюдения из-

менения продукции лецитиназы на агаризованных средах является концентрация 0,5%.

Хотя на сердечно-мозговой среде (Difco) наблюдалась четко выраженная индукция лецитиназной активности в присутствии активированного угля, тем не менее эта среда не является оптимальной для масштабных исследований в силу причин экономического характера. Поэтому были исследованы другие среды, представленные на отечественном рынке (табл. 4).

Оптимальные результаты помимо с сердечно-мозговой средой (Difco) получены и со средой ГРМ № 1 (Оболенск). При добавлении к этой среде желтка куриного яйца (см. материал и методы исследования) штаммы дикого типа без угля не проявляли лецитиназной активности, а в присутствии 0,5% активированного угля демонстрировали четко различимую активность уже через 24 ч в виде плотной зоны помутнения шириной 2–4 мм, которая спустя 48 ч достигала 6–10 мм. На других протестированных средах индукции лецитиназной активности не было или наблюдалось нечеткое исчезающее гало, трудное для интерпретации.

В работе использовали активированный уголь фирмы «Merck» и отечественный. Различий в лецитиназной активности при использовании отечественного и импортного угля не было.

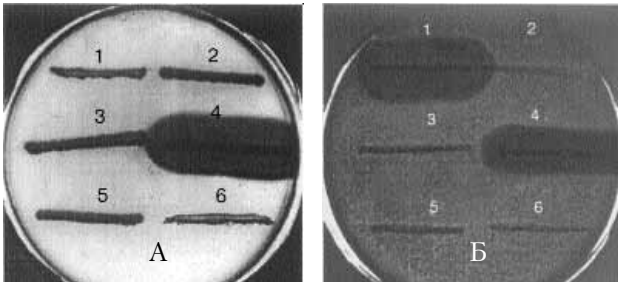
**Индукция лецитиназной активности в присутствии активированного угля характерна только для *L. monocytogenes*.** Важный вопрос – поведение других видов листерий в присутствии активированного угля. Только два вида листерий, отличных от *L. monocytogenes*, имеют в своем геноме ген, кодирующий лецитиназу [13]. Это патогенный вид *L. ivanovii* и непатогенный – *L. seeligeri*.

На среде ГРМ № 1 с желтком оба исследованных штамма *L. ivanovii* проявляли лецитиназную активность как при отсутствии активированного угля, так и в его присутствии (табл. 5, рис. 2). Непатогенные виды листерий, включая два штамма *L. seeligeri*, не обладали лецитиназной активностью независимо от присутствия угля.

Таким образом, индукция лецитиназной активности, по-видимому, характерна только для *L. monocytogenes*, но не для других видов листерий.

Бактериологическая характеристика листерий в клинических образцах иногда бывает затруднена





**Рис. 2.** Индукция лецитиназной активности в присутствии активированного угля характерна для *L. monocytogenes*, но не для других *Listeria* spp. Культуры выращивали при температуре 37°C в течение 48 ч на среде ГРМ № 1, содержащей желток куриного яйца: А – без угля, Б – в присутствии 0,5% активированного угля. 1 – *L. monocytogenes* NCTC 10527, 2 – *L. welshimeri* SLCC 5334, 3 – *L. innocua* ATCC 33090, 4 – *L. ivanovii* ATCC 19119, 5 – *L. seeligeri* SLCC 5921, 6 – *L. grayi* 17

из-за изменчивости этого возбудителя и склонности его к образованию кокковидных форм. Мы сравнили поведение ряда бактерий, морфологически сходных с листериями, на среде ГРМ № 1 с желтком при отсутствии и в присутствии 0,5% активированного угля.

Как видно из данных табл. 6 и на рис. 3, у исследованных микроорганизмов не наблюдалось эффекта появления лецитиназной активности в зависимости от присутствия активированного угля. *Enterococcus faecalis* и *Escherichia coli* не проявляли лецитиназной активности. Исследованные стафилококки, напротив, на используемой среде как в присутствии, так и при отсутствии активированного угля характеризовались лецитиназной активностью, образуя плотные зоны помутнения непосредственно около штриха культуры и зоны просветления далее.

### Обсуждение результатов исследования

Для дифференциации листерий от представителей других родов бактерий используют морфологические признаки, а также тесты на каталазу и по-

движность [7, 12]. Для листерий характерна каталазоположительность, и хотя сообщалось об изоляции каталазоотрицательных штаммов *L. monocytogenes*, в нашем исследовании все штаммы демонстрировали положительную каталазную реакцию.

Что касается подвижности (в полужидком агаре листерии подвижны при температуре 18–25°C и неподвижны при 37°C), то, хотя действительно все штаммы *L. monocytogenes* соответствовали этому признаку, 87% штаммов *L. innocua* были подвижны и при температуре 37°C и при 20°C, а один из 4 штаммов *L. welshimeri* оставался неподвижным при комнатной температуре.

Другие методы бактериологической идентификации, позволяющие, в частности, дифференцировать патогенные и непатогенные виды листерий, часто дают противоречивые результаты. Характерный  $\beta$ -гемолиз на кровяном агаре у значительного числа штаммов *L. monocytogenes* выражен слабо, так что наличие гемолитической активности остается под вопросом. Один из 26 штаммов *L. monocytogenes* вообще не проявлял гемолитической активности.

Наилучшие результаты для дифференциации листерий получены с использованием теста API *Listeria* (bioMerieux) и в ПЦР. Однако API тест является слишком дорогим для рутинной диагностики листериоза. Использование же только некоторых сахаров, входящих в «цветной ряд», не позволяло достоверно дифференцировать представителей рода *Listeria* друг от друга.

Специфичность и высокая чувствительность ПЦР подтверждены на чрезвычайно широком спектре микроорганизмов, в том числе на патогенных листериях. Проводя анализ имеющейся коллекции, мы столкнулись, однако, с неожиданной проблемой – плохим лизисом некоторых штаммов листерий, грозящих, в частности, ложноотрицательными результатами.

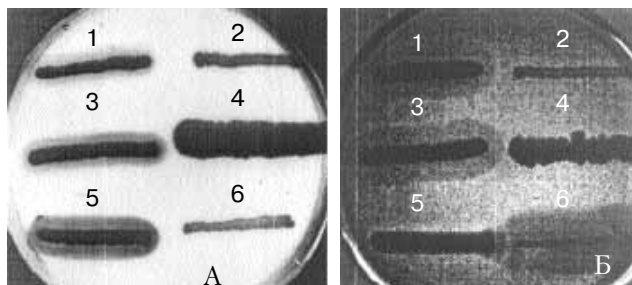
В то же время ряд авторов сообщает о проведении ПЦР с использованием листериозных клеток, добавляемых в реакционную смесь без предварительной обработки литическими ферментами [14]. Плохой лизис, очевидно, связанный со строением клеточной стенки, является штаммоспецифическим признаком. Этот вопрос, по-видимому, заслуживает дальнейшего изучения, так как длительная предварительная обработка образца существенно увеличивает время анализа и сводит на нет одно из основных преимуществ ПЦР – быстроту получения результата.

Недавно было продемонстрировано, что в присутствии активированного

**Таблица 6. Лецитиназная активность бактерий, не принадлежащих к роду *Listeria*, на среде ГРМ № 1, содержащей и не содержащей активированный уголь**

Вид, количество изученных штаммов	Гидролизуют лецитин, %	
	независимо от угля	только в присутствии угля
<i>Escherichia coli</i> , n=6	0	0
<i>Enterococcus faecalis</i> , n=5	0	0
<i>Staphylococcus aureus</i> , n=6	100	0
<i>Staphylococcus haemolyticus</i> , n=3	100	0
<i>Staphylococcus epidermidis</i> , n=1	100	0





**Рис. 3.** Сравнение лецитиназной активности *L. monocytogenes* и ряда бактерий, принадлежащих к другим родам. Культуры выращивали при температуре 37°C в течение 48 ч на среде ГРМ № 1, содержащей желток куриного яйца: А - без угля, Б - в присутствии 0,5% активированного угля. 1 - *S. aureus*, 2 - *E. faecalis*, 3 - *S. epidermidis*, 4 - *E. coli*, 5 - *S. haemolyticus*, 6 - *L. monocytogenes*

угля существенно возрастает продукция практически всех факторов патогенности *L. monocytogenes*, в том числе обладающих легко выявляемым фенотипическим проявлением гемолизина листерий - листериолизина и лецитиназы [7, 10]. Однако уровень индукции этих факторов в присутствии активированного угля значительно отличается.

Так, в питательном сердечно-мозговом бульоне (Difco) в присутствии активированного угля гемолитическая активность штамма NCTC 10527 увеличивается в 10 раз, а лецитиназной - почти в 250 раз [10]. Это заставило нас использовать именно лецитиназную активность при разработке метода дифференциации *L. monocytogenes* на агаризованных средах.

Увеличение продукции факторов патогенности в присутствии активированного угля связано с адсорбцией им, а следовательно, с устранением из среды культивирования ауторепрессорного продукта, вырабатываемого самими листериями [10]. Поэтому этот эффект не должен был бы зависеть от состава среды культивирования. Тем не менее мы наблюдали существенную разницу в индукции лецитиназной активности на разных средах, в том числе на средах одного наименования, выпускаемых разными фирмами-изготовителями. Пока этот вопрос детально не исследован, однако можно предположить несколько возможных объяснений.

В о - п е р в ы х, компоненты среды могут влиять на адсорбционную емкость угля, в частности, адсорбирующие его свойства могут быть значительно уменьшены присутствием в среде даже следовых количеств детергентов.

В о - в т о р ы х, наблюдаемый эффект увеличения лецитиназной активности связан не только с количеством продуцируемой лецитиназы, но и с ее

энзиматической активностью, зависящей от влияния ряда внешних факторов, концентрация которых в среде может варьировать [12].

Анализ коллекции штаммов *L. monocytogenes* показал, что индукция лецитиназной активности в присутствии активированного угля характерна для большинства штаммов. Три штамма, два из которых не индуцировались в присутствии угля, а один характеризовался постоянной продукцией лецитиназы, принадлежат к коллекциям NCTC и SLCC. Для штаммов, в течение ряда лет хранившихся в коллекциях и многократно пересевавшихся на искусственных питательных средах, характерно накопление мутаций, влияющих на продукцию факторов патогенности [15].

В нашей лаборатории проводится картирование мутаций, приведших к изменениям в индукции лецитиназной активности у перечисленных штаммов. Предварительные данные свидетельствуют, что конститутивная продукция лецитиназы у штамма NCTC 5105 сопровождается также увеличенной продукцией других факторов патогенности.

В отличие от *L. monocytogenes* для других видов листерий, имеющих ген лецитиназы, *L. ivanovii* и *L. seeligeri*, специфической индукции лецитиназной активности в зависимости от присутствия активированного угля не наблюдалось. Это, по-видимому, связано с межвидовыми различиями в регуляции экспрессии факторов патогенности.

Имеющиеся данные свидетельствуют в пользу того, что причиной увеличения уровня продукции лецитиназы и других факторов патогенности у *L. monocytogenes* является активация положительного регулятора экспрессии факторов патогенности PrfA [8]. Регуляторный белок PrfA высокоомологичен у *L. monocytogenes*, *L. ivanovii* и *L. seeligeri*. Однако в его последовательности у этих 3 видов есть аминокислотные замены, вероятно, влияющие на его функциональные свойства.

Биохимически очень близкий к *L. monocytogenes* вид *L. innocua*, как и другие виды листерий, за исключением перечисленных, не имеет в своем геноме гена, кодирующего лецитиназу [13]. Это позволяет надежно дифференцировать возбудителя листериоза от непатогенных листерий, что особенно важно при анализе штаммов, выделенных из продуктов питания.

В клинических образцах возбудитель листериоза морфологически может быть сходен с различными кокками и дифтероидами. Известны случаи ложной идентификации энтерококков, стафилококков и коринебактерий как *L. monocytogenes* и наоборот. Индукция лецитиназной активности в присутствии активированного угля позволяет надежно

дифференцировать листерии от непродуцирующих лецитиназу *Enterococcus* spp. и *Escherichia coli*. Напротив, отсутствие лецитиназной активности на среде, не содержащей угля, отличает возбудитель листериоза от стафилококков.

Приведенные результаты нашей работы позволяют рассматривать индукцию лецитиназной активности в зависимости от присутствия активированного угля как практически значимый способ

дифференциации патогенного вида *L. monocytogenes* от представителей рода *Listeria* и других морфологически сходных бактерий.

**Благодарности.** Авторы выражают признательность фирме «HiMedia Laboratories Ltd» за бесплатно предоставленные образцы питательных сред.

## Литература

1. Тартаковский И.С. Листерии: роль в инфекционной патологии человека и лабораторная диагностика. Клинический микробиологический журнал 2000; 2:20-30.
2. Farber J.M., Peterkin P.I. *Listeria monocytogenes*, a food borne parasite. Microbiol Rev 1991; 55:476-511.
3. Котляров В.М., Бакулов И.А. Листерииоз – нейроинфекция животных и людей. В кн.: Материалы международной научно-практической конференции «Нейроинфекции: бешенство, губкообразная энцефалопатия крупного рогатого скота, Крейтцфельда–Якоба и другие прионные болезни; листериоз, болезнь Ауески, болезнь Тешена», Россия. Покров; 2001. с.105-13.
4. Mead P.S., Slutsker L., Diez V., et al. Food-related illness and death in the United States. Emerging Infect Dis 1999; 5:607-26.
5. Подунова Л.Г., Ясинский А.А., Опочинский Э.Ф. и др. Анализ деятельности центров Госсаннадзора РФ по лабораторной диагностике листериоза. В кн: Инфекционный сборник статистических и аналитических материалов. Раздел 2. Москва; 2000.
6. Vazquez-Boland J.A., Kocks C., Dramsi S., et al. Nucleotide sequence of the lecithinase operon of *Listeria monocytogenes* and possible role of lecithinase in cell-to-cell spread. Infect Immun 1992; 60:219-30.
7. Бакулов И.А., Васильев Д.А. Листерииоз как пищевая инфекция. Вопросы диагностики и профилактики. Учебное пособие. Ульяновск; 1991.
8. Ripio M.T., Dominguez-Bernal G., Suarez M., et al. Transcriptional activation of virulence genes in wild-type strains of *Listeria monocytogenes* in response to a change in the extracellular medium composition. Res Microbiol 1996; 147:371-84.
9. Ермолаева С.А., Белый Ю.Ф., Тартаковский И.С. Изменение уровня экспрессии факторов вирулентности *Listeria monocytogenes* под влиянием внешних условий. Мол ген микробиол вирусол 2000; 1:17-9.
10. Ermolaeva S.A., Belyi Yu.F., Tartakovskii I.S. Characteristics of induction of virulence factor expression by activated charcoal in *Listeria monocytogenes*. FEMS Microbiol Lett 1999; 174:137-41.
11. Ермолаева С.А. Получение рекомбинантной фосфатидил-инозитол специфичной фосфолипазы С *Listeria monocytogenes* и оценка ее диагностической значимости [диссертация]. Москва; 1994.
12. Hitchins A.D. FDA Bacteriological Analytical Manual, *Listeria monocytogenes*. 8th edition. 1995.
13. Gouin E., Mengaud J., Cossart P. The virulence gene cluster of *Listeria monocytogenes* is also present in *Listeria ivanovii*, an animal pathogen, and *Listeria seeligeri*, a non-pathogenic species. Infect Immun 1994; 62:3550-3.
14. Destro M.T., Leitao M.F., Farber J.M. Use of molecular typing methods to trace the dissemination of *Listeria monocytogenes* in a shrimp processing plant. Appl Environ Microbiol 1996; 62:705-11.
15. Pine L., Weaver R.E., Carlone G.M., et al. *Listeria monocytogenes* ATCC 35152 and NCTC 7973 contain a non-hemolytic, nonvirulent variant. J Clin Microbiol 1987; 25:2247-51.

УДК 616.931:314.4

## Заболееваемость дифтерией в Европейском регионе ВОЗ. Рекомендации ВОЗ по контролю, лечению и профилактике дифтерии

Н. Эмироглу

### Diphtheria Situation in the European Region of WHO. WHO Recommendations on Control, Treatment and Management of Diphtheria

N. Emiroglu

#### Введение

В 1990 г. в Российской Федерации началась эпидемия дифтерии, которая к концу 1994 г. охватила все 15 *новых независимых государств* (ННГ). В 1995 г. число случаев дифтерии на территории ННГ составило 88% от общего числа случаев дифтерии, зарегистрированных во всем мире. С 1990 по 1996 гг. количество заболевших дифтерией, зарегистрированных в России, составило 75% от числа всех случаев на территории ННГ (от 59 до 84% в зависимости от года).

С 1990 по 1999 гг. на территории бывшего Советского Союза было зарегистрировано 158 000 случаев дифтерии и 4000 летальных исходов, связанных с данным заболеванием.

#### Эпидемиологическая ситуация

В 1990 г. на территории ННГ было зарегистрировано 1436 случаев дифтерии. К 1992 г. число больных увеличилось до 5815, в 1993 г. – до 19 604 (прирост – 239%), в 1994 г. – до 47 869 (прирост – 144%), достигнув пика в 1995 г., к концу которого общее

число заболевших дифтерией за 5 лет эпидемии насчитывало уже 50 434.

В 1995 г., несмотря на снижение заболеваемости в России дифтерией на 10%, в целом отмечен ее рост, что связано с почти двукратным увеличением общего числа случаев дифтерии в других ННГ. Тем не менее в 1996 г. число новых случаев заболевания уменьшилось на 60% по сравнению с предыдущим годом и составило 20 385.

Снижение заболеваемости дифтерией в России в 1995 г. и других ННГ в 1996 г. явилось результатом внедрения в практику системы мероприятий по контролю над этой инфекцией. Тенденция снижения заболеваемости сохранилась в 1997 и 1998 гг., когда было зарегистрировано соответственно 7182 (снижение на 64%) и 2783 (снижение на 62%) случая дифтерии.

В результате решительных действий, предпринятых в России, а также благодаря сотрудничеству между странами, вовлеченными в эпидемию, и *Межведомственным координационным комитетом по иммунизации* (ПСС), заболеваемость дифтерией в регионе значительно снизилась. В 1999 г. на территории ННГ было зарегистрировано 730 случаев

дифтерии, а в 2000 г. (по предварительным отчетам) – 452.

В начале эпидемии летальность при дифтерии в некоторых странах ННГ достигала очень высокого уровня (более 20%), что объясняется недостатком антитоксической сыворотки и поздним началом лечения. Однако в 1996 г. благодаря своевременному обеспечению стационаров противодифтерийной сывороткой и улучшению лечения больных дифтерией летальность стала ниже 5% в 11 из 15 ННГ.

Возрастное распределение пациентов, вовлеченных в эпидемию, оказалось нетипичным для дифтерии: большинство заболевших составляли подростки и взрослые. Территориальная распространенность эпидемии соответствовала географическому распределению населения. Эпидемия характеризовалась в основном как городская, за исключением стран центральной Азии и Кавказа, где большая часть населения проживает в сельских районах.

С учетом эпидемиологических особенностей все ННГ, охваченные эпидемией, можно разделить на следующие группы.

1. Значительный прогресс в контроле над дифтерией достигнут в Армении, Азербайджане, Беларуси, Эстонии, Казахстане,

Контактный адрес:  
Dr. Nedret Emiroglu  
Regional Adviser on EPI WHO EURO  
Эл. почта: NEM@who.dk

Литве и Молдове, где отмечается низкая заболеваемость, а эпидемия стала контролируемой: в 2000 г. не сообщалось о дифтерии в Армении, а в Эстонии и Литве зарегистрировано 2 случая заболевания, в Азербайджане – 6. Тенденция к снижению заболеваемости наблюдается также в Беларуси, Казахстане и Молдове.

2. Мероприятия по контролю дифтерии еще нуждаются в дальнейшем совершенствовании в Грузии, Кыргызстане, Российской Федерации, Таджикистане, Туркменистане и на Украине.

Эпидемиологическая ситуация значительно улучшилась в Грузии, где в 2000 г. зарегистрировано 26 случаев дифтерии по сравнению с 288 в 1997 г. Отчетливая тенденция к снижению заболеваемости дифтерией отмечается в Российской Федерации, где, по данным ежемесячных отчетов, в 2000 г. зарегистрировано 113 случаев. Улучшилась обстановка в Киргизии, Таджикистане и на Украине.

В Таджикистане, несмотря на очень трудные экономические и социальные условия, в которых реализуется программа по контролю над дифтерией, ситуация значительно улучшилась: в 1999 г. зарегистрировано всего 35 случаев дифтерии по сравнению с 723 в 1997 г.

Увеличение числа случаев дифтерии в Туркменистане в 1999 г. (49 по сравнению с 17, зарегистрированными в 1998 г.) требует тщательного наблюдения.

3. Беспокойство вызывает эпидемиологическая обстановка по дифтерии в Латвии, где отмечается высокая заболеваемость, а данные эпидемиологического надзора отражают типичную для дифтерии эпидемиологическую картину, характеризующуюся высоким охватом вакцинацией детей и неполным охватом взрослого населения. Тенденция к рос-

ту заболеваемости дифтерией (42 случая в 1997 г., 81 – в 1999 г., 221 – по предварительным отчетам, в 2000 г.), вероятно, обусловлена низким охватом вакцинацией взрослого населения и трудностью вовлечения его в процесс иммунизации.

Так, имеется сообщение органов здравоохранения о вспышке дифтерии в военной академии Латвии в августе 2000 г., во время которой заболело 115 курсантов и выявлено 49 носителей токсигенных штаммов коринебактерий. В результате эпидемиологического расследования, проведенного ВОЗ совместно с *центрами по контролю и профилактике заболеваний (CDC)*, эксперты пришли к выводу, что вспышка дифтерии в военной академии была не совсем типичной для данной инфекции: подавляющее большинство курсантов оказалось своевременно вакцинированными. При этом используемый для прививок в Латвии дифтерийный анатоксин был безопасным и эффективным.

Тем не менее количество взрослых, вакцинированных с января 1996 г., было недостаточным для создания необходимого уровня коллективного иммунитета населения. При этом условия совместного проживания курсантов способствовали быстрому распространению инфекции. Немедленно начатое лечение лиц с подозрением на дифтерию и быстрое внедрение в практику системы мероприятий по контролю над вспышкой дифтерии в академии позволило ограничить дальнейшее распространение заболевания.

### **Призыв к немедленным действиям по контролю дифтерии в ННГ**

В 1995 г. Международная Федерация Красного Креста (IFRC), ЮНИСЕФ и ВОЗ обра-

тились с призывом к немедленным действиям по контролю над дифтерией в ННГ. Правительственные и неправительственные организации совместно с ООН развернули широкомасштабную программу по предоставлению всем ННГ материалов, необходимых для борьбы с эпидемией дифтерии, за ходом которой наблюдал ИСС.

Международными организациями, главным образом странами – членами ИСС, было выделено более 25 млн долларов США на обеспечение вакцинами, антитоксической сывороткой, антибиотиками, шприцами, иглами и оборудованием для «холодовой цепи» (путь вакцины от момента производства до ее введения) и другими средствами.

В Российской Федерации мероприятия по контролю над дифтерией начались в 1992 г. с массовой иммунизации, охватившей в 1992–1994 гг. большую часть взрослого населения. В последующем подобные мероприятия предпринимались и в других ННГ. В Азербайджане, Литве, Молдове и Таджикистане в ходе массовой иммунизации относительно быстро был достигнут высокий охват населения профилактическими прививками (80% и более во всех возрастных группах).

Однако, несмотря на то что оптимальный уровень охвата населения вакцинацией во всех ННГ не был достигнут и не соблюдались соответствующие графики иммунизации, проведенные мероприятия по контролю над дифтерией оказались высокоэффективными.

Все страны изменили стратегию иммунизации детей, сократив перечень противопоказаний, ограничив использование при проведении первичного комплекса иммунизации низкоэффективных вакцин против диф-

терии и увеличив тем самым долю детей, привитых своевременно высокоиммуногенными препаратами. Одновременно с ростом числа вакцинированных увеличилось также и число заболевших среди иммунизированного населения. Однако заболевание у вакцинированных протекало, как правило, в значительно более легкой форме.

В мероприятия по контролю над дифтерией вовлекались общественные организации и образовательные учреждения, а также система подготовки медицинских работников. Эти мероприятия осуществлялись в условиях тесного сотрудничества между ННГ и международными организациями, обеспечивавшими их реализацию, – Международной федерацией Красного Креста, ЮНИСЕФ, ВОЗ, центрами по контролю и профилактике заболеваний и программами PATH и BASIC (по инициативе USAID).

Сформированная в 1993 г. при участии 20 стран Западной и Восточной Европы, США, Австралии и Юго-Восточной Азии *Европейская лабораторная рабочая группа по дифтерии* (ELWGD) сотрудничает и координирует деятельность по поддержке стран, нуждающихся в совершенствовании системы надзора, в целях раннего выявления больных дифтерией и контактных лиц путем тщательного микробиологического контроля и создания сети национальных и международных лабораторий.

Создание этой группы дало возможность микробиологам европейских стран, особенно ННГ, сотрудничать со специалистами в области диагностики дифтерии и устанавливать связи между ведущими институтами и лабораториями.

### **Рекомендации ВОЗ по контролю, лечению и профилактике дифтерии**

Дифтерия представляет собой распространенное тяжелое инфекционное заболевание, способное к эпидемическому распространению.

План действий по профилактике и контролю дифтерии в Европейском регионе ВОЗ включает 3 основных направления:

- 1) первичную профилактику заболевания путем создания высокого уровня коллективного иммунитета, достигаемого массовой иммунизацией населения;
- 2) раннюю диагностику и соответствующее ведение пациентов с дифтерией;
- 3) срочное эпидемиологическое расследование в очаге заболевания и соответствующее ведение контактных лиц.

Программы всех европейских стран направлены на достижение высокого охвата населения профилактическими прививками путем плановой вакцинации, ликвидацию «пробелов» в иммунизации взрослого населения, точную диагностику и соответствующее ведение пациентов с дифтерией и контактных лиц.

#### **А. Цели иммунизации**

- В каждом районе охват вакцинацией (3 дозы вакцины АКДС) детей в возрасте до 2 лет должен достигать 95%.
- В каждом районе детям школьного возраста должна проводиться *бустерная иммунизация* вакциной, содержащей дифтерийный анатоксин, при этом охват прививками в данной возрастной группе должен достигать 95%
- Охват вакцинацией взрослого населения должен составлять не менее 90%, при этом бустерную иммунизацию (предпочтительнее

анатоксином АДС-М) следует проводить каждые 10 лет.

При выявлении низкого уровня иммунитета в какой-либо возрастной, социальной или этнической группе следует разработать и реализовать программу мер по повышению уровня коллективного иммунитета. Она может включать бустерную иммунизацию через определенные интервалы времени, массовую вакцинацию населения или другие возможности иммунизации.

Массовая иммунизация лиц в возрасте старше 25 лет, относящихся к группе высокого риска (медицинские работники, военнослужащие, работники общественной сферы, часто контактирующие с населением в ходе выполнения профессиональных обязанностей, лица без определенного места жительства, больные алкоголизмом) проводится вакцинами, содержащими дифтерийный анатоксин (предпочтительнее использовать анатоксин АДС-М).

В случае возникновения вспышки заболевания и соответствующей эпидемиологической ситуации:

- в массовую иммунизацию должно быть вовлечено все взрослое население;
- дополнительно следует провести массовую иммунизацию детей в школах и дошкольных учреждениях, чтобы гарантированно обеспечить у всех детей протективный уровень специфического иммунитета; она включает завершение или выполнение первичного комплекса иммунизации у детей с незавершенной вакцинацией и неиммунизированных детей, а также бустерную иммунизацию детей с законченной вакцинацией, у которых от последнего введения вакцины прошло более 5 лет.

**Примечание.** Все используемые вакцины должны соответст-



воваться требованиям, предъявляемым ВОЗ. Для вакцинации детей в возрасте старше 7 лет и взрослых следует использовать вакцины, содержащие низкие дозы дифтерийного анатоксина.

По рекомендациям ВОЗ, единственное противопоказание к вакцинации против дифтерии и столбняка – неврологические осложнения в анамнезе или тяжелые аллергические реакции на предшествующее введение вакцины. Легкие формы заболевания, курсы иммуносупрессивной терапии, беременность и хронические заболевания не являются противопоказаниями к вакцинации.

## Б. Надзор за дифтерией

### Определение случая заболевания дифтерией

*Клиническая картина:* заболевание, характеризующееся ларингитом или фарингитом, или тонзиллитом с трудно снимающимися пленчатыми налетами на миндалинах, стенке глотки и/или в полости носа.

### Лабораторные критерии диагностики дифтерии:

- выделение *C. diphtheriae* из клинического материала (типичная локализация: нос, ротоглотка, язвы на коже, раны, конъюнктивы, ухо, влагалитце);

- или нарастание титра специфических антител в парных сыворотках в 4 и более раз при условии, что кровь для исследования взята до введения анатоксина или антитоксической сыворотки.

### Классификация случая заболевания

Каждый случай дифтерии должен быть классифицирован как вероятный или подтвержденный. Подтвержденные случаи заболевания дифтерией, в свою очередь, следует подразделять на местные или завозные.

Для классификации случаев дифтерии необходимо пользоваться следующими определениями:

- *вероятный* – заболевание, по клинической картине соответствующее дифтерии;

- *подтвержденный* – вероятный случай, подтвержденный лабораторными методами или эпидемиологически связанный с другим, лабораторно подтвержденным случаем дифтерии.

**Примечание.** Заболевания, вызванные *C. ulcerans* или нетоксигенными штаммами *C. diphtheriae*, не входят в определение случая заболевания дифтерией.

Лица с положительными результатами культурального исследования на *C. diphtheriae*, но не имеющие клинических проявлений заболевания, то есть бессимптомные носители, не рассматриваются как вероятные или подтвержденные случаи дифтерии.

Микроскопическое исследование нативных мазков не является достаточно точным методом диагностики и не может заменить культуральное исследование материала.

### Рекомендуемые виды мероприятий эпидемиологического надзора за дифтерией

1. Ежемесячное сообщение в центральные органы эпидемиологической службы сводных данных о всех вероятных и подтвержденных случаях заболевания дифтерией на местном уровне. Для всех уровней эпидемиологического надзора обязательно предоставление отчетов даже при отсутствии случаев дифтерии.

2. При возникновении вспышки заболевания следует немедленно провести эпидемиологическое расследование в очаге и собрать необходимые данные о всех выявленных случаях заболеваний.

3. Для стран с низким охватом населения вакцинацией рекомен-

дуется немедленно извещать центральные органы эпидемиологической службы о каждом вероятном или подтвержденном случае дифтерии, зарегистрированном на местном уровне.

## В. Ведение больных дифтерией

### Сбор анамнеза и физическое обследование

Каждому пациенту с дифтерией должно быть проведено всестороннее клиническое обследование. Необходимо также собрать следующую информацию о пациенте:

- *паспортные* данные – фамилия, имя, отчество, возраст, пол, место жительства, название лечебного учреждения, данные о лечащем враче и т. д.;

- *лабораторные* данные – характер материала для культурального исследования, дата взятия материала;

- *клинические* данные – дата начала заболевания, клинические симптомы, проводимое лечение (антибактериальная терапия, введение антитоксической сыворотки);

- *эпидемиологические* данные – состояние специфического иммунитета, сведения о поездках, перечень контактировавших с пациентом лиц, включая детей, посещающих детские дошкольные учреждения.

### Лабораторные методы исследования дифтерии

До начала антибактериальной терапии необходимо взять материал для исследования из ротоглотки и носа и/или образцы налетов и/или материал с пораженных участков кожи. До начала введения противодифтерийной антитоксической сыворотки следует провести серологическое исследование с целью определения содержания дифтерийного антитоксина, так как обнаружение его в сыворотке крови ниже защит-

ного уровня ( $<0,001$  МЕ/мл) даже при отрицательном результате культурального исследования может свидетельствовать в пользу диагноза дифтерии.

#### Лечение дифтерии

При подозрении на дифтерию специфическое лечение противодифтерийной сывороткой и антибиотиками следует начать немедленно, не ожидая результатов бактериологического исследования. Основа лечения дифтерии – введение специфической антитоксической сыворотки. В то же время необходимо назначить антибактериальную терапию с целью эрадикации возбудителя и предупреждения распространения заболевания.

*Противодифтерийная антитоксическая сыворотка* должна назначаться немедленно, так как отсроченное ее введение значительно увеличивает риск развития поздних осложнений, таких, как миокардит и полинейропатия.

Перед введением сыворотки пациенту следует поставить пробу на определение гиперчувствительности к лошадиной сыворотке, а при необходимости назначить десенсибилизирующую терапию. Доза антитоксической сыворотки зависит от локализации и распространенности патологического процесса, выраженности интоксикации и длительности заболевания (см. таблицу). Однако применяемые на практи-

ке дозы сыворотки могут варьировать в зависимости от рекомендации производителей и национальных служб здравоохранения.

При развитии картины острой анафилаксии в ответ на введение специфической сыворотки следует немедленно ввести внутривенно 0,2–0,5 мл адреналина в разведении 1:1000.

Введение антитоксической сыворотки при дифтерии кожи и ран, вероятно, не имеет практического значения. Однако некоторые специалисты применяют от 20 000 до 40 000 ЕД специфической сыворотки в связи с имеющимися сообщениями о возможном развитии при данной форме заболевания токсических осложнений.

*Антибиотики.* Антибиотиками выбора при дифтерии являются эритромицин или пенициллин. Из препаратов группы пенициллина предпочтителен бензилпенициллин прокаин для внутримышечного введения (для детей – 25 000–50 000 ЕД/кг в сутки, для взрослых – 1,2 млн ЕД/сут в 2 введения).

Вместо пенициллина может быть рекомендована ступенчатая терапия эритромицином: сначала препарат вводится парентерально (40–50 мг/кг в сутки, максимальная суточная доза – 2 г) до тех пор, пока глотание у пациента станет безболезненным, затем эритромицин принимается внутрь 4 раза в сутки.

В качестве альтернативного препарата может использоваться феноксиметилпенициллин (внутри по 125–250 мг 4 раза в сутки).

Общая длительность антибактериальной терапии должна составлять не менее 14 дней. Больной обычно перестает быть контактным уже через 48 ч от начала приема антибиотиков. Полная эрадикация возбудителя из организма должна быть подтверждена двукратными отрицательными результатами бактериологического исследования, выполненного после окончания лечения.

*Изоляция пациентов.* Пациент должен находиться в условиях строгой изоляции до получения отрицательных результатов бактериологического исследования материала из ротоглотки и носа, проведенного не ранее чем через 24 ч после отмены антибиотиков. Все предметы, с которыми непосредственно контактировал пациент, а также предметы, загрязненные его выделениями, должны дезинфицироваться во время нахождения пациента в условиях изоляции.

*Иммунизация.* Перенесенная манифестная форма дифтерии **не гарантирует** формирования естественного специфического иммунитета. В связи с этим пациенты с клинически выраженными формами заболевания **должны быть вакцинированы до выписки из стационара.**

#### Рекомендуемые дозы противодифтерийной антитоксической сыворотки и пути ее введения в зависимости от клинической формы дифтерии

Клиническая форма дифтерии	Доза сыворотки, ЕД	Путь введения
Дифтерия носа	10 000–20 000	Внутримышечный
Локализованная дифтерия ротоглотки	15 000–25 000	Внутримышечный или внутривенный
Распространенная дифтерия ротоглотки или дифтерия гортани	20 000–40 000	Внутримышечный или внутривенный
Дифтерия нескольких локализаций или поздно диагностированная дифтерия	40 000–60 000	Внутримышечный или внутривенный

Ранее не вакцинированным лицам следует немедленно ввести 1 дозу вакцины, содержащей дифтерийный анатоксин, а в последующем завершить первичный вакцинальный комплекс, состоящий не менее чем из 3 доз вакцины.

Лицам с незаконченным курсом вакцинации следует завершить первичный комплекс иммунизации согласно национальному календарю профилактических прививок.

### Г. Выявление и ведение контактных лиц

#### Определение лиц, находившихся в тесном контакте с больным дифтерией

Лица, находившиеся в предыдущие 7 дней в тесном контакте с больным дифтерией (до его выявления), вызванной токсигенными штаммами *C. diphtheriae*, составляют группу риска заражения дифтерией. К лицам, находившимся в тесном контакте с пациентом, относятся:

- члены семьи;
- друзья, родственники и персонал, регулярно посещающий место проживания больного;
- половые партнеры или лица, имевшие интимные контакты с больным;
- контакты в школе;
- лица, работающие с больным в одном помещении;
- медицинские работники, контактировавшие с выделениями из ротоглотки больного.

#### Медицинское наблюдение

За лицами, тесно контактировавшими с больным дифтерией, должно быть установлено медицинское наблюдение в течение 7 дней с момента последнего контакта с целью раннего выявления симптомов заболевания. При первом появлении симптомов дифтерии этим лицам следует ввести противодифтерийную анитоксическую сыворотку.

#### Лабораторное обследование

Частота носительства токсигенных штаммов *C. diphtheriae* у лиц из внутрисемейных контактов может превышать 25%. Выявление инфицированных среди контактных должно ограничиваться условиями, в которых мог иметь место интимный физический контакт или воздушно-капельная передача возбудителя.

Всем контактным лицам должно быть проведено культуральное исследование мазков из носа и ротоглотки независимо от их вакцинального статуса. Контактные лица также должны быть обследованы на наличие ран и повреждений кожи, а в случае их обнаружения необходимо провести бактериологическое исследование материала, взятого с пораженных участков.

В отношении контактных лиц, у которых получены положительные результаты культурального исследования, должны быть приняты следующие меры:

- бактерионосители должны избегать тесных контактов с неадекватно вакцинированными лицами;
- необходимо установить круг лиц, находившихся в тесном контакте с носителем, и провести по отношению к ним те же профилактические мероприятия, что и в отношении лиц, контактировавших с больным дифтерией; профилактические мероприятия в отношении лиц, контактировавших с носителем, считаются важными, но менее приоритетными, чем мероприятия в отношении лиц, имевших тесный контакт с больным дифтерией;
- повторить культуральное исследование не ранее чем через 2 нед после завершения курса антибактериальной терапии, чтобы гарантировать полную эрадикацию возбудителя; лица, продол-

жающие выделять коринебактерии, должны пройти дополнительный курс лечения эритромицином в течение 10 дней, а затем дополнительное бактериологическое обследование.

#### Антибиотикопрофилактика

У контактных лиц рекомендуется применять следующие режимы антибиотикопрофилактики:

- бензатин бензилпенициллин – внутримышечно однократно (для детей в возрасте менее 6 лет – 600 000 ЕД, для детей старше 6 лет и взрослых – 1,2 млн ЕД);
- эритромицин – в течение 7–10 дней (для детей – 40 мг/кг в сутки, для взрослых – 1 г/сут); этот антибиотик является приемлемой альтернативой, однако не может быть рекомендован в качестве основного препарата из-за низкой комплаентности;
- выявленные среди населения носители токсигенных штаммов коринебактерий также должны получить курс антибактериальной терапии (хронические носители, не прошедшие лечение, могут выделять возбудитель в течение 6 мес и более).

#### Иммунизация

Всем контактным лицам с незаконченным курсом вакцинации (то есть получившим менее 3 доз дифтерийного анатоксина), а также лицам с неизвестным прививочным анамнезом следует ввести бустерную дозу вакцины, содержащей дифтерийный анатоксин, а затем завершить вакцинацию согласно действующему календарю профилактических прививок.

Контактные лица, окончившие курс вакцинации, также должны подвергнуться бустерной иммунизации, но только при условии, что она не проводилась в течение последних 12 мес.

## Хроника МАКМАХ

В 2001 г. *Межрегиональной ассоциации по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии* (МАКМАХ), созданной и зарегистрированной в июне 1997 г., исполнилось 4 года. В ее состав входят представители медицинской общественности различных специальностей: клинические фармакологи, микробиологи, терапевты, хирурги, акушеры-гинекологи и др.

В настоящее время МАКМАХ имеет 27 региональных отделений, насчитывающих около 1000 членов.

### Отчетно-выборная конференция

В соответствии с Уставом ассоциации 18 июня 2001 г. состоялась очередная отчетно-выборная конференция МАКМАХ. На ней обсуждались отчеты правления ассоциации за 1997–2001 гг. и ревизионной комиссии, были переизбраны президент ассоциации и члены правления, а также разработана стратегия деятельности МАКМАХ на ближайшие 4 года.

В работе конференции участвовали делегаты региональных отделений и члены правления МАКМАХ. С отчетом правления выступил президент МАКМАХ **Л.С. Страчунский**. Основные положения доклада представлены ниже.

### Образовательная деятельность МАКМАХ

При участии и под эгидой МАКМАХ за 4 года в 15 регионах России организованы и проведены 31 конференция и 10 семинаров. В том числе:

- республиканский семинар

«Антимикробная химиотерапия», Казань (1997);

- семинар «Диагностика и антибактериальная терапия инфекций верхних дыхательных путей», Санкт-Петербург (1997);

- конференция «Клиническая микробиология: роль в лечебно-диагностическом процессе и эпидемиологии», Новосибирск (1997);

- семинар «Диагностика и антибактериальная терапия инфекций верхних отделов дыхательных путей у детей», Москва (1998);

- научно-практический семинар «Антибиотики в амбулаторной практике», Санкт-Петербург (1998);

- конференция «Актуальные вопросы инфекционной патологии в клинике внутренних болезней и хирургической практике», Красноярск (1998);

- научно-практический семинар «Антибиотики в амбулаторной практике», Санкт-Петербург (1998);

- конференция, посвященная 100-летию кафедры микробиологии, вирусологии и иммунологии им. Д.К. Заболотного Санкт-Петербургского государственного медицинского университета им. академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург (1998);

- конференция «Современные подходы к антибактериальной терапии инфекций мочевыводящих путей», Ростов-на-Дону (1998);

- симпозиум «Инфекции мочевыводящих путей в амбулаторной практике», Москва (1999);

- конференция «Современ-

ные принципы антибактериальной терапии», Владивосток (1999);

- научно-практическая международная конференция «Антибиотикотерапия», Ташкент (1999);

- конференция «Современные принципы антибиотикотерапии в акушерстве и гинекологии», Краснодар (2000);

- конференция «Антибактериальная терапия на пороге XXI века», Волгоград (2000);

- конференция «Антибиотикотерапия в отоларингологии», Краснодар (2000);

- семинар с международным участием «Особенности выделения, идентификации и определения чувствительности пиогенных стрептококков», Смоленск (2001);

- семинар с международным участием «Современные подходы к выявлению наиболее частых механизмов резистентности», Москва (2001).

В рамках Российского национального конгресса «Человек и лекарство» в 2000–2001 гг. проведены V и VI школы по антимикробной химиотерапии, в которых участвовали более 300 человек из различных регионов России.

Большая группа представителей региональных отделений МАКМАХ участвовала в работе *II Европейского конгресса по химиотерапии* (ЕСС) в Гамбурге (1998) и в *IX Европейского конгресса по клинической микробиологии и инфекционным болезням* (ЕССMID) в Берлине (1999).

## Научно-исследовательская деятельность

При организационной и методической поддержке МАКМАХ выполнены или находятся в стадии завершения следующие проекты:

- **АРГОН** – изучение чувствительности *Neisseria gonorrhoeae* к антибактериальным препаратам;
- **АРМИД** – исследование возбудителей инфекций мочевыводящих путей у детей;
- **КроХА** – изучение частоты назофарингеального носительства *Streptococcus pneumoniae* и *Haemophilus influenzae* у здоровых детей, посещающих детские дошкольные учреждения, и чувствительности этих микроорганизмов к антибиотикам;
- **ПеГАС** – исследование чувствительности основных возбудителей инфекций верхних дыхательных путей: *Streptococcus pneumoniae*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes*;
- **СтЭнт** – исследование антибиотикорезистентности у *Staphylococcus aureus* и *Enterococcus spp.*;
- многоцентровое исследование состояний антибиотикопрофилактики в абдоминальной хирургии.
- **УТИАР-1, 2** – исследования чувствительности возбудителей внебольничных острых неосложненных инфекций мочевыводящих путей.

Общее количество штаммов, изученных за 4 года, приближается к 20 000. Благодаря реализации научных проектов получена достоверная информация о состоянии антибиотикорезистентности возбудителей инфекций дыхательных и мочевыводящих путей у детей и взрослых и нозокомиальных инфекций, что способствовало оптимизации использования антибактериальных препаратов.

В 1997–1998 г. осуществлялась программа *внешнего контроля качества (ВКК) МАКМАХ/ВОЗ* с участием 19 лабораторий 12 городов России.

В 1999–2000 г. при участии 53 лабораторий из 30 городов России прошла программа *эпидемиологического надзора за антибиотикорезистентностью возбудителей нозокомиальных инфекций (INSPEAR)*.

## Научные публикации

В 21 отечественном и зарубежном издании опубликованы 105 работ. Под эгидой МАКМАХ вышли в свет следующие методические рекомендации и информационные письма:

- «Состояние антибиотикорезистентности грамотрицательных возбудителей нозокомиальных инфекций в отделениях интенсивной терапии»;
- «Чувствительность гонококков к антибиотикам и выбор антибактериальных препаратов при гонококковой инфекции»;
- «Выявление резистентности к метицилину и другим бета-лактамам антибиотикам методом скрининга»;
- «Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Streptococcus pneumoniae*»;
- «Выделение, идентификация и определение чувствительности к антибиотикам *Haemophilus influenzae*»;
- «Чувствительность к антимикробным препаратам штаммов шигелл и сальмонелл, выделенных в г. Екатеринбурге»;
- «Фенотипическая идентификация энтеробактерий».

## Журнал «Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия»

В 1999 г. начат выпуск ежеквартального периодического издания МАКМАХ – журнала

«Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия» (КМАХ). В состав редакции, редакционной коллегии и международного редакционного совета журнала входят ведущие отечественные и зарубежные ученые.

Все статьи, поступающие в редакцию, анонимно рецензируются двумя независимыми специалистами, а также статистиком. В среднем отклоняется 31% поступающих статей. Выпущено 6 номеров журнала (без № 3, 2001 г.), в которых опубликована 71 статья: 71% – статьи отечественных авторов, 29% – иностранных.

Подписка на журнал открыта во всех отделениях связи. Бесплатные версии всех номеров журнала размещены на информационном портале МАКМАХ.

## Информационный портал МАКМАХ

В 1999 г. совместно с НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии был создан информационный ресурс – сайт «Антибиотики и антимикробная терапия» ([www.antibiotic.ru](http://www.antibiotic.ru)). На сайте представлены разделы «Антибактериальные препараты», «Резистентность», «Конференции», «Библиотека», «Вопросы и ответы» и др.

Ежедневно обновляется раздел медицинских новостей. Количество ежедневных посетителей, по данным внутренней статистики сайта (хитов), составляет 11–12 тыс. С начала создания сайт посетили 3 355 165 человек.

## Международные конференции МАКМАХ

В июне 1998 г. в Москве состоялась I Международная конференция МАКМАХ «Нозокомиальные инфекции в отделениях реанимации и интенсивной терапии» (присутствовали 425 человек), в мае 1999 г. – II конфе-



рениция «Антибактериальная терапия в педиатрической практике» (аудитория – 480 человек), в июле 2000 г. – III конференция «Антибиотики и антибиотикорезистентность на пороге XXI века» (участвовали 520 человек).

Проведение международных конференций МАКМАХ стало ежегодным событием.

С отчетом о финансовой деятельности МАКМАХ выступила председатель ревизионной комиссии **О.П. Галеева**. Основную статью расходов МАКМАХ составили поддержка деятельности региональных отделений, издание методических рекомендаций, организация семинаров, конференций и симпозиумов под эгидой МАКМАХ. На работу аппарата были направлены менее 12% целевых поступлений, что соответствует уставным требованиям.

Во время обсуждений финансовой деятельности были подняты вопросы поддержки региональных отделений, подготовки научно-практических рекомендаций по работе с питательными средами, создания центра по микробиологической диагностике и подготовки письма в Минздрав России о введении должности главного клинического микробиолога.

При рассмотрении вопросов выступили **М.Н. Зубков**, **О.П. Галеева**, **В.В. Тец** и другие делегаты.

С предложением усилить сотрудничество ассоциации с другими общественными объединениями микробиологов и клиницистов, в частности с «Альянсом клинических химиотерапевтов и микробиологов», выступил **С.В. Скальский**. Это предложение полностью поддержали **Л.С. Страчунский** и другие члены правления.

### Итоги выборов

На голосование в правление МАКМАХ было предложено 12 кандидатур, из них предстояло выбрать 9.

По итогам тайного голосования президентом МАКМАХ был избран **Л.С. Страчунский**, директор НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии, вице-президентами – **М.Н. Зубков**, заместитель главного врача Городской больницы № 23 (Москва) и **А.А. Фирсов**, заведующий лабораторией НИИ по изысканию новых антибиотиков (Москва).

Казначеем ассоциации избрана **О.И. Кречикова**, заведующая микробиологической лабораторией Центра госсанэпиднадзора, (Смоленск), секретарем – **Д.В. Галкин**, кафедра клинической фармакологии Смоленской государственной медицинской академии.

В правление МАКМАХ вошли **В.А. Руднов** – кафедра анестезиологии и реаниматологии Уральской государственной медицинской академии (Екатеринбург), **С.В. Сидоренко** – заведующий лабораторией ГНЦ по антибиотикам Минпромнауки РФ (Москва), **А.И. Синопальников** – Государственный институт усовершенствования врачей Министерства обороны РФ, главный редактор журнала «Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия» (Москва), **И.В. Смоленов**, кафедра клинической фармакологии (Волгоград).

### IV Международная конференция МАКМАХ

IV конференция МАКМАХ состоялась в Москве 20–21 июня 2001 г. Она была организована Минздравом России, Российской академией медицинских наук и

НИИ антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии при поддержке Американского общества по микробиологии (ASM), Европейского общества по клинической микробиологии и инфекционным болезням (ESCMID), Федерации европейских обществ по химиотерапии инфекций (FESCI), Международного общества по инфекционным болезням (ISID) и Общества Пауля Эрлиха (PEG).

В ее работе приняли участие более 850 человек из 75 городов России и стран ближнего зарубежья – Армении, Белоруссии, Грузии, Казахстана, Таджикистана, Узбекистана, Украины, Латвии и Эстонии. Из 30 учреждений Москвы и Московской области на конференции присутствовали более 250 (около 30%) человек. Аудитория была представлена клиницистами (81%), клиническими микробиологами (15%) и эпидемиологами (4%).

На рассмотрение научного комитета конференции (председатель – **А.И. Синопальников**) поступили 203 работы, из них приняты к публикации в сборнике тезисов конференции 89 (44%).

За 2 дня на конференции выступили 19 иностранных и 15 российских докладчиков. На 2 пленарных заседаниях и 9 симпозиумах были заслушаны 46 докладов. Из них 24 представлены иностранными докладчиками, 22 – российскими.

Конференцию открыл президент РАМН **В.И. Покровский**. Во вступительном слове он обратил внимание на большую общественную значимость резистентности микроорганизмов к антибактериальным препаратам. Участников конференции приветствовали: от имени *Международного общества по инфекционным болезням (ISID)* **Ж. Акар**, Франция, и *Американского обще-*

ства по микробиологии (ASM) – **С. Лернер**, США.

На пленарном заседании в первый день конференции обсуждались проблемы антимикробной резистентности в Европе и России и последние достижения антибактериальной терапии. В этот день также прошли симпозиумы «Современные направления в терапии микозов», «Политика выбора антибактериальных препаратов в отделениях реанимации и интенсивной терапии», «Новые возможности терапии тяжелых бактериальных инфекций». Под эгидой Европейской комиссии состоялся также симпозиум «Контроль дифтерии в Европе и Российской Федерации».

На второй день на пленарном заседании рассматривались проблемы биотерроризма, антибиотикопрофилактики в хирургии, клиническое значение влияния антибиотиков на иммунитет, причины их неэффективности. Состоялись симпозиумы «Перспективы антиинфекционной терапии в новом тысячелетии», «Место парентеральных цефалоспоринов в терапии нозокомиальных инфекций», «Перспективы использования новых фторхинолонов», «Молекулярная эпидемиология и диагностика бактериальных инфекций».

Под эгидой Общероссийского общественного фонда «Здоровье человека» и Общества Пауля Эрлиха прошел симпозиум «Федеральное руководство для врачей

как инструмент оптимизации антимикробной терапии».

Симпозиумы были посвящены современным направлениям в терапии микозов, тяжелых бактериальных инфекций, перспективам антиинфекционной терапии в новом тысячелетии, выбора антибактериальных препаратов в отделениях реанимации и интенсивной терапии. Многие данные, отраженные в сообщениях, являлись оригинальными и часто еще не были опубликованы.

Впервые в преддверии конференции был проведен научно-практический семинар «Современные подходы к выявлению основных механизмов резистентности». МАКМАХ выражает искреннюю благодарность за организацию и проведение семинара директору Государственного научного центра по антибиотикам **А.М. Егорову** и его сотрудникам, а также председателю Международной комиссии Американского общества по микробиологии **С. Лернеру**.

Лекции на семинаре и занятия проводили ведущие специалисты США – **С. Шарп**, **М. Собболл** и **С. Лернер**. В работе семинара участвовали 54 заведующих лабораториями крупнейших городов России и других стран СНГ. Лекции перед семинаром посетили 86 человек. К сожалению, «формат» семинара не позволил принять в нем участие всем желающим.

Проведение подобных семинаров на регулярной основе обсуждается правлениями МАКМАХ и ASM.

В рамках конференции 18 июня 2001 г. состоялся круглый стол «Респираторные фторхинолоны», посвященный перспективам использования новых представителей этой важнейшей группы антимикробных препаратов. С докладами выступили **А. Бриске** (Франция) и **А.Г. Чучалин** (Россия).

Накопленный за 4 года опыт показал, что тематика такого рода конференций должна быть максимально разносторонней.

V юбилейная конференция МАКМАХ состоится 4–6 июня 2002 г. в Москве, в здании Российской академии государственной службы при Президенте РФ.

Большее внимание на V конференции будет уделено клиническим аспектам (острый панкреатит, инфекции кожи и мягких тканей, инфекции в уронефрологии, заболевания, передаваемые половым путем, и др.). Как и в предыдущие годы, конференция пройдет под эгидой Министерства Российской Федерации и Российской академии медицинских наук.

Впервые конференция МАКМАХ будет поддержана *Британским обществом по антимикробной химиотерапии (BSAC)* и *Испанским обществом по химиотерапии (SSC)*.

## Краткие правила для авторов

(Полная версия правил публикуется в 1-м номере каждого тома журнала)

Материалы для публикации в журнале следует отправлять по адресу:

125284, г. Москва, а/я 74,

редакция журнала

«Клиническая микробиология и антимикробная химиотерапия»

или (предпочтительно) по электронной почте на адрес [smac@antibiotic.ru](mailto:smac@antibiotic.ru)

### Требования к представляемым рукописям

#### Краткое изложение технических требований:

- печатайте все разделы рукописи через 2 интервала между строками;
- все страницы должны быть последовательно пронумерованы;
- представляйте материалы в следующем порядке: титульная страница, резюме и ключевые слова, основной текст, выражения признательности, список литературы, таблицы (каждая на отдельном листе), рисунки (каждый на отдельном листе);
- рукопись должна содержать разрешение на воспроизведение ранее опубликованного материала и на использование иллюстраций, позволяющих опознать изображенных на них людей;
- к рукописи должен быть приложен документ, подтверждающий передачу права на публикацию;
- обязательно укажите контактный адрес с указанием фамилии и полного имени и отчества контактного лица.

#### Титульная страница должна содержать:

- 1) название статьи;
- 2) фамилию и инициалы каждого автора с указанием учреждения;
- 3) фамилию, имя, отчество и адрес автора, ответственного за ведение переписки, связанной со статьей.

#### Вторая страница

Вторая страница должна содержать резюме (объемом не более 250 слов).

Под резюме помещается подзаголовок «Ключевые слова», а после него – 3–10 ключевых слов или коротких фраз, которые будут способствовать правильному перекрестному индексированию статьи и могут быть опубликованы вместе с резюме.

#### Этические вопросы

Если в статье имеется описание биомедицинских исследований на человеке, укажите, соответствовали ли они этическим стандартам Комитета по экспериментам на человеке (входящего в состав учреждения, в котором выполнялась работа, или регионального) или Хельсинкской декларации 1975 г. и ее пересмотренного варианта 1983 г. Не используйте фамилии, инициалы больных и номера историй болезни, особенно на рисунках или фотографиях.

#### Статистика

Описывайте статистические методы настолько детально, чтобы грамотный читатель, имеющий доступ к исходным данным, мог проверить полученные Вами результаты. По возможности подвергайте полученные данные количественной оценке и представляйте их с соответствующими показателями ошибок измерения и неопределенности (такими, как доверительные интервалы). Не следует полагаться исключительно на статистическую проверку гипотез, например, на использование значений  $p$ , которые не отражают всей полноты информации. Обоснуйте выбор экспериментальных объектов. Приведите детали процесса рандомизации. Опишите, какие методы были применены для обеспечения «слепого» контроля и насколько успешно.

При описании структуры исследования и статистических методов ссылки должны приводиться по возможности на известные руководства и учебники. Укажите, какие компьютерные программы, доступные для широкого пользователя, применялись в Вашей работе.

#### Список литературы

Нумеруйте ссылки последовательно, в порядке их первого упоминания в тексте. Обозначайте ссылки в тексте, таблицах и подписях к рисункам арабскими цифрами в квадратных скобках. Ссылки, относящиеся только к таблицам или подписям к рисункам, должны быть пронумерованы в соответствии с первым упоминанием в тексте определенной таблицы или рисунка.

Названия журналов должны быть сокращены в соответствии со стилем, принятом в Index Medicus (<http://www.nlm.nih.gov>).

В ссылках на статьи, принятые в печать, но еще неопубликованные, нужно указать: «в печати». При этом авторы должны получить письменное разрешение на упоминание таких статей и подтверждение, что они действительно приняты к публикации. Информация из рукописей, представленных, но еще не принятых в печать, должна обозначаться в тексте как «неопубликованные наблюдения» (обязательно наличие согласия автора).

Не допускаются ссылки на «личные сообщения», за исключением тех случаев, когда они содержат важную информацию, которую нельзя получить другими способами.

Ссылки должны быть сверены авторами с оригинальными документами.

### Статьи в журналах

#### 1. Стандартная журнальная статья

Если в статье не более 6 авторов, то указываются все авторы:

Vega K.J., Pina I., Krevsky B. Heart transplantation is associated with an increased risk for pancreatobiliary disease. *Ann Intern Med* 1996 Jun 1; 124(11):980-3.

Если в томе сохраняется последовательная нумерация страниц, как это делается в большинстве медицинских журналов, месяц выпуска и номер журнала не указываются.

Если в статье более 6 авторов, перечислите первых 3 автора и добавьте «и соавт. (et al.)»:

Parkin D.M., Clayton D., Black R.J., et al. Childhood leukaemia in Europe after Chernobyl: 5 years follow up. *Br J Cancer* 1996; 73:1006-12.

#### 2. Организация в качестве автора

The Cardiac Society of Australia and New Zealand. Clinical exercise stress testing. Safety and performance guidelines. *Med J Aust* 1996; 164:282-4.

#### 3. Автор не указан

Cancer in South Africa [editorial]. *S Afr Med J* 1994; 84:15.

#### 4. Статья написана не на английском языке

Примечание: НМБ переводит название статьи на английский язык, помещает его в квадратные скобки и добавляет сокращенное название языка статьи.

Отечественные статьи указываются на русском языке.

#### 5. Том с приложением

Shen H.M., Zhang Q.F. Risk assessment of nickel carcinogenicity and occupational lung cancer. *Environ. Health Perspect* 1994; 102 (Suppl 1): 275-82.

#### 6. Номер с приложением

Payne D.K., Sullivan M.D., Massie M.J. Women's psychological reactions to breast cancer. *Semin Oncol* 1996; 231 (Suppl 2):89-97.

#### 7. Том, разделенный на части

Ozben T., Nacitarhan S., Tuncer N. Plasma and urine sialic acid in non-insulin dependent diabetes mellitus.

*Ann Clin Biochem* 1995; 32 (Pt 3): 303-6.

#### 8. Номер, разделенный на части

Poole G.H., Mills S.M. One hundred consecutive cases of flap lacerations of the leg in ageing patients. *N Z Med J* 1994; 107 (986 Pt 1):377-8.

#### 9. Журнал, номера которого не объединяются в тома

Turan I., Wredmark T., Fellander-Tsai L. Arthroscopic ankle arthrodesis in rheumatoid arthritis. *Clin Orthop* 1995; (320):110-4.

#### 10. Журнал без деления на тома или номера

Browell D.A., Lennard T.W. Immunologic status of the cancer patient and the effects of blood transfusion on antitumor responses. *Curr Opin Gen Surg* 1993:325-33.

#### 11. Нумерация страниц римскими цифрами

Fisher G.A., Sikic B.I. Drug resistance in clinical oncology and hematology. Introduction. *Hematol Oncol Clin North Am* 1995; 9 (2):XI-XII.

#### 12. Три статьи, указываемый при необходимости

Enzensberger W., Fisher P.A. Metronome in Parkinson's disease [letter]. *Lancet* 1996; 347:1337.

Clement J., De Bock R. Hematological complications of hantavirus nephropathy (HVN) [abstract]. *Kidney Int* 1992; 42:1285.

#### 13. Статья, содержащая опровержение

Garey C.E., Schwarzman A.L., Rise M.L., Seyfried T.N. Ceruloplasmin gene defect associated with epilepsy in EL mice [retraction of Garey C.E., Schwarzman A.L., Rise M.L., Seyfried T.N. In: *Nat Genet* 1994; 6:426-31] *Nat Genet* 1995; 11:104.

#### 14. Статья с опубликованным впоследствии опровержением

Liou G.I., Wang M., Matragoon S. Precocious IRBP gene expression during mouse development [retracted in *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:3127]. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 1994; 35:1083-8.

#### 15. Статья с последующим опубликованием исправленной части или списка опечаток

Hamlin J.A., Kahn A.M. Herniography in symptomatic patients following inguinal hernia repair [published erratum appears in *West J Med*

1995; 162:278]. *West J Med* 1995; 162:28-31.

### Книги и другие монографии

#### 16. Физические лица в качестве авторов

Ringsven M.K., Bond D. Gerontology and leadership skills for nurses. 2nd ed. Albany (NY): Delmar Publishers; 1996.

#### 17. Редакторы, составители в качестве авторов

Norman I.J., Redfem S.J., editors. Mental health care for elderly people. New York: Churchill Livingstone; 1996.

#### 18. Организация в качестве автора и издателя

Institute of Medicine (US). Looking at the future of the Medicaid program. Washington: The Institute; 1992.

#### 19. Глава в книге

Phillips S.J., Whisnant J.P. Hypertension and stroke. In: Laragh J.H., Brenner B.M., editors. Hypertension: pathophysiology, diagnosis, and management. 2nd ed. New York: Raven Press; 1995. p. 465-78.

#### 20. Материалы конференции

Kimura J., Shibasaki H., editors. Recent advances in clinical neurophysiology. Proceedings of the 10th International Congress of EMG and Clinical Neurophysiology; 1995 Oct 15-19; Kyoto, Japan. Amsterdam: Elsevier; 1996.

#### 21. Доклад на конференции

Bengtsson S., Solheim B.G. Enforcement of data protection, privacy and security in medical informatics. In: Lun K.C., Degoulet P., Piemme T.E., Rienhoff O., editors. MED-INFO 92. Proceedings of the 7th World Congress on Medical Informatics; 1992 Sep 6-10; Geneva, Switzerland. Amsterdam: North Holland; 1992. p. 1561-5.

#### 22. Научный или технический отчет

Изданный финансирующей организацией:

Smith P., Golladay K. Payment for durable medical equipment billed during skilled nursing facility stays. Final report. Dallas (TX): Dept. of Health and Human Services (US), Office of Evaluation and Inspections; 1994 Oct. Report No.: HHSI-GOEI69200860.



Изданный исполняющей организацией:

Field M.J., Tranquada R.E., Feasley J.C., editors. Health services research: work force and educational issues. Washington: National Academy Press; 1995. Contract No.: АНСРР282942008. Sponsored by the Agency for Health Care Policy and Research.

#### 23. Диссертация

Kaplan S.J. Posthospital home health care: the elderly's access and utilization [dissertation]. St. Louis (MO): Washington Univ.; 1995.

#### 24. Патент

Larsen C.E., Trip R., Johnson C.R., inventors; No-voste Corporation, assignee. Methods for procedures related to the electrophysiology of the heart. US patent 5,529,067. 1995 Jun 25.

### Другие опубликованные материалы

#### 25. Газетная статья

Lee G. Hospitalizations tied to ozone pollution: study estimates 50 000 admissions annually. The Washington Post 1996 Jun 21; Sect. A:3 (col. 5).

#### 26. Аудио- и видеоматериалы

HIV+/AIDS: the facts and the future [videocassette]. St. Louis (MO): Mosby-Year Book; 1995.

#### 27. Юридические материалы

Публичное право:

Preventive Health Amendments of 1993, Pub. L. No. 103-183, 107 Stat. 2226 (Dec. 14, 1993).

Законопроект:

Medical Records Confidentiality Act of 1995, S. 1360, 104th Cong., 1st Sess. (1995).

Кодекс Федеральных правил:

Informed Consent, 42 C.F.R. Sect. 441.25.7 (1995).

Материалы слушания:

Increased Drug Abuse: the Impact on the Nation's Emergency Rooms:

Hearings Before the subcomm. on Human Resources and Intergovernmental Relations of the House Comm.

on Government Operations, 103rd Cong., 1st Sess. (May 26, 1993).

#### 28. Карта

North Carolina. Tuberculosis rates per 100,000 population, 1990 [demographic map]. Raleigh: North Carolina Dept. of Environment, Health, and Natural Resources, Div. of Epidemiology; 1991.

#### 29. Библия

The Holy Bible. King James Version. Grand Rapids (MI): Zondervan Publishing House; 1995. Ruth 3:1-18.

#### 30. Словари и аналогичные издания

Stedman's medical dictionary. 26th ed. Baltimore: Williams & Wilkins; 1995. Apraxia; p. 119-20.

#### 31. Классическая литература

The Winter's Tale: act 5, scene 1, lines 13-16. The complete works of William Shakespeare. London: Rex; 1973.

### Неопубликованные материалы

#### 32. В печати

Примечание: вместо формулировки «в печати» НМБ предпочитает формулировку «готовится к выходу», так как не все статьи будут напечатаны.

Leshner A.I. Molecular mechanisms of cocaine addiction. N Engl J Med. In press 1996.

### Электронные материалы

#### 33. Журнальная статья в электронном формате

Morse S.S. Factors in the emergence of infectious disease. Emerg Infect Dis [serial on line] 1995 Jan-Mar [cited 1996 Jun 5]; 1(1): [24 screens]. Available from: URL: <http://www.cdc.gov/ncidod/EID/eid.htm>

#### 34. Монография в электронном формате

CDI, clinical dermatology illustrated [monograph on CD ROM]. Reeves J.P.T., Maibach H. CMEA Multimedia Group, producers. 2nd ed.

Version 2.0. San Diego: CMEA; 1995.

#### 35. Компьютерный файл

Hemodynamics III: the ups and downs of hemodynamics [computer program]. Version 2.2. Orlando (FL): Computerized Educational Systems; 1993.

### Таблицы и рисунки

Печатайте каждую таблицу/рисунок на отдельном листе.

Все таблицы/рисунки должны быть озаглавлены и пронумерованы в порядке первого упоминания в тексте. Все разъяснения следует помещать в примечаниях (сносках), а не в названии таблицы/рисунка.

Убедитесь, что все таблицы/рисунки упомянуты в тексте.

Если Вы используете данные из другого опубликованного или неопубликованного источника, получите на это разрешение и полностью приведите источник.

### Единицы измерения

Измерения длины, высоты, ширины и объема должны представляться в метрических единицах (метр, килограмм, литр) или в их десятичных долях.

Температуру следует приводить в градусах Цельсия, а артериальное давление – в миллиметрах ртутного столба.

Все гематологические и биохимические показатели должны представляться в единицах метрической системы (Международной системы единиц – SI).

### Сокращения и символы

Используйте только стандартные сокращения (аббревиатуры). Не применяйте сокращения в названии статьи и в резюме. Полный термин, вместо которого вводится сокращение, должен предшествовать первому применению этого сокращения в тексте (если только это не стандартная единица измерения).