

На правах рукописи

Решедько Галина Константиновна

**ФАРМАКОДИНАМИЧЕСКОЕ ОБОСНОВАНИЕ ПОВЫШЕНИЯ
ЭФФЕКТИВНОСТИ АМИНОГЛИКОЗИДОВ ПРИ ЛЕЧЕНИИ ГРАМ(-)
ГОСПИТАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЙ**

14.00.42 - клиническая фармакология

А в т о р е ф е р а т

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Смоленск – 1997

Работа выполнена в Смоленской государственной медицинской академии

Научный руководитель - доктор медицинских наук профессор

Л.С. Страчунский

Научный консультант - доктор медицинских наук профессор

С.В. Сидоренко

ОФИЦИАЛЬНЫЕ ОППОНЕНТЫ:

доктор медицинских наук профессор **А.Н. Цой**

доктор медицинских наук профессор **Е.Н. Падейская**

Ведущая организация - Российский государственный медицинский университет

Защита состоится “___”_____ 1997 г. в _____ часов на заседании диссертационного совета К 084.34.02 Смоленской государственной медицинской академии (214019, г. Смоленск, ул. Крупской, 28).

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке Смоленской государственной медицинской академии.

Автореферат разослан “___”_____ 1997 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета

кандидат медицинских наук доцент

Т.Г. Степина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы. Наблюдаемый в последние годы рост абсолютного количества госпитальных инфекций выдвигает повышенные требования к антибактериальной терапии (R.C. Spencer, 1992, С.В. Сидоренко, 1992). В этиологии госпитальных инфекций доминирующими являются аэробные грам(-) бактерии (С.С. Белокрысенко, Л.С. Дугашева, 1984, A.N. Maniatis et al., 1997). Наиболее распространенными подходами к терапии госпитальных грам(-) инфекций являются комбинации β -лактамов и аминогликозидов, прежде всего II и III поколений: гентамицина, тобрамицина, нетилмицина, амикацина и исепамицина (W.E. Sciegenthaler et al., 1986, J.E. Pennington, 1995).

Современные руководства по антимикробной химиотерапии, хотя и содержат в себе рекомендации о необходимости использования аминогликозидов для лечения госпитальных грам(-) инфекций, не дают четких обоснований выбора конкретного препарата этой группы (Н.В. Белобородова, 1997). Выбор препаратов для лечения может осуществляться на основе различных параметров: токсичности, стоимости, удобства применения у больного. Однако, наиболее важной является фармакодинамика антибиотиков, от которой зависит эффективность проводимой терапии.

Фармакодинамика антибиотиков подразумевает их действие на микроорганизмы, а также изменение их активности в зависимости от характера механизмов резистентности. Рутинная оценка чувствительности к антибиотикам, проводимая в бактериологических лабораториях, не позволяет достаточно надежно прогнозировать тенденции распространения устойчивости к аминогликозидам и, соответственно, осуществлять перспективное планирование выбора антибиотиков (D.A. Goldmann, 1991). Поэтому большое фундаментальное и прикладное значение имеет изучение механизмов резистентности к антибиотикам у клинических изолятов (J.J. Marr et al., 1988, K. Gourgouli et al., 1995).

Основным механизмом устойчивости микроорганизмов к аминогликозидам является модификация молекулы антибиотика бактериальными ферментами. Фосфорилированные, ацетилированные или аденилированные аминогликозиды не способны эффективно связываться с бактериальными рибосомами и нарушать синтез белка, а следовательно, и жизнедеятельность клетки (А.С. Таисова., 1990, L.B. Rice et al., 1996).

Исследования механизмов устойчивости проводятся во многих странах. Штаммы, продуцирующие аминогликозидмодифицирующие ферменты (АГМФ), широко распространены в мире. Так, например, в Греции преобладают ферменты, модифицирующие нетилмицин и амикацин, в Германии - гентамицин и тобрамицин, а в странах Латинской Америки встречаются с одинаковой частотой ферменты, модифицирующие гентамицин, тобрамицин, нетилмицин, амикацин и исепамицин (G. Miller, 1992). В России механизмы резистентности к аминогликозидам у клинических изолятов не изучались до 1992 года.

Цель исследования. Целью настоящей работы явилась разработка фармакодинамических подходов повышения эффективности аминогликозидных антибиотиков при госпитальных грам(-) инфекциях.

Основные задачи исследования. Для реализации цели исследования необходимо было решить следующие задачи:

1. Обследовать больных с госпитальными инфекциями с целью получения репрезентативной выборки клинических штаммов грам(-) микроорганизмов, отражающей этиологическую структуру госпитальных инфекций в многопрофильных стационарах различных регионов.
2. Изучить структуру лекарственной устойчивости к аминогликозидам у микроорганизмов, выделенных от больных в отделениях с интенсивным использованием антибиотиков.
3. Исследовать механизмы резистентности госпитальных грам(-) микроорганизмов к аминогликозидным антибиотикам.
4. Обосновать оптимальный выбор аминогликозидных антибиотиков для терапии госпитальных инфекций, обусловленных грам(-) бактериями.

Научная новизна исследования.

Впервые:

- изучены механизмы резистентности репрезентативной выборки госпитальных штаммов грам(-) бактерий к аминогликозидным антибиотикам в многопрофильных стационарах различных регионов России;
- установлено, что основным механизмом устойчивости у госпитальных грам(-) бактерий к аминогликозидам является их ферментативная модификация. Устойчивости, связанной с изменением структуры чувствительной мишени (30S субъединицы рибосом) не выявлено. В единичных случаях причиной устойчивости явилась полная непроницаемость наружной мембраны микроорганизмов;

- показано, что наиболее часто встречающимися ферментами являются APH(3')-I, детерминирующий устойчивость к канамицину, неомицину; ANT(2''), определяющий устойчивость к гентамицину, канамицину, тобрамицину; AAC(3)-V, детерминирующий устойчивость к гентамицину, канамицину, тобрамицину, нетилмицину:
- в России выявлены ферменты, обуславливающие устойчивость к амикацину, причем основным амикацинмодифицирующим ферментом был APH(3')-VI.
- предложены схемы оптимального выбора аминогликозидных антибиотиков в зависимости от их фармакодинамики.

Практическая ценность работы.

Предложены схемы выбора аминогликозидов для рутинного тестирования в лабораториях клинической микробиологии.

Предложена дифференцированная схема выбора аминогликозидов для включения в формуляр лечебных учреждений.

Полученные данные позволяют исключить применение недостаточно эффективных аминогликозидных антибиотиков и прогнозировать эффективность новых аминогликозидов в терапии госпитальных грам(-) инфекций.

Создана компьютерная база данных по структуре и механизмам резистентности клинических штаммов грам(-) микроорганизмов к аминогликозидным антибиотикам, являющаяся основой системы мониторинга за уровнем аминогликозидрезистентности.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Фармакодинамика аминогликозидов отличается в многопрофильных стационарах различных регионов России.
2. Основным механизмом резистентности к аминогликозидам у госпитальных грам(-) возбудителей является продукция модифицирующих ферментов: ANT(2''), AAC(3)-V и APH(3')-I.
3. Учет локальных данных по фармакодинамике аминогликозидов позволяет прогнозировать их эффективность в лечении госпитальных грам(-) инфекций.
4. При выборе аминогликозидов для рутинного тестирования в лабораториях клинической микробиологии и для включения в больничный формуляр необходимо исходить из их фармакодинамики.

Внедрение результатов в практику. Практические рекомендации, разработанные в диссертации, используются в работе СОКБ и микробиологической лаборатории Областного центра Госсанэпиднадзора г. Смоленска. Основные положения работы излагаются на лекциях и семинарах при проведении занятий со студентами и интернами на кафедре клинической фармакологии и антимикробной химиотерапии Смоленской государственной медицинской академии, с врачами на кафедре микробиологии с курсом клинической химиотерапии Российской медицинской академии постдипломного образования и курсах специализации и усовершенствования врачей-бактериологов при Областном центре Госсанэпиднадзора г. Смоленска.

Апробация работы. Результаты исследования доложены на 18 Международном конгрессе по химиотерапии (Стокгольм, 1993), на 6 Международном конгрессе по инфекционным болезням (Прага, 1994), Конференции молодых ученых (Смоленск, 1995), Второй школе Альпийско-Адриатического региона по инфекционным болезням и химиотерапии (Цриквеница, 1995), II и III Российском национальном конгрессе "Человек и лекарство" (Москва, 1995, 1996), а также на межкафедральном заседании СГМА (1997).

По материалам диссертации опубликовано 12 научных работ, из них 7 в зарубежной печати.

Структура и объем работы. Диссертация изложена на 125 страницах машинописи и состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, результатов и обсуждения собственных исследований, выводов и научно-практических рекомендаций. Работа иллюстрирована 14 таблицами и 14 рисунками. Список литературы состоит из 146 источников, в том числе 33 на русском языке и 113 на иностранном.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования. Исследование проводили в четырех стационарах: Смоленской областной клинической больнице (СОКБ) в период с 1993 по 1996 гг, Главном военном клиническом госпитале им. Н.Н. Бурденко г. Москвы (ГВКГ), Центральной клинической больнице г. Москвы (ЦКБ) и Краснодарской краевой клинической больнице (КККБ). Было включено 569 пациентов с госпитальными инфекциями, находившихся на стационарном лечении в отделениях

с интенсивным использованием антибактериальных препаратов: взрослом и детском реанимационных, гнойной хирургии, ожоговом, торакальной хирургии, урологическом. Больные были с госпитальными пневмониями, инфекциями мочевыводящих путей, нагноением ожоговых поверхностей и послеоперационных ран. Для исследования отбирали следующий клинический материал: мокроту, аспират, получаемый при бронхоскопии, плевральную жидкость, мочу, отделяемое из дренажей, мазки из ран.

Определение чувствительности выделенных клинических штаммов аэробных грам(-) бактерий к аминогликозидам проводили диско-диффузионным методом и с помощью E-тестов на коммерческих агарх Mueller-Hinton и PDM ASM II. Интерпретацию полученных результатов проводили с помощью критериев NCCLS.

Механизмы устойчивости у отобранных резистентных штаммов определяли двумя методами: AGRP (Aminoglycoside Resistance Patterns) и ДНК-ДНК гибридизации. AGRP является фенотипическим методом, основанном на соответствии профиля резистентности исследуемого микроорганизма субстратной специфичности вырабатываемого фермента. Для этого в работе использовали набор коммерческих дисков с аминогликозидами, а также их производных с модифицированной структурой, предоставленными профессором G. Miller (Schering Corp., США): фортимицином, 6'-этилнетилмицином, 2'-этилнетилмицином, 5-ОН-эписизомицином, апрамицином, исепамицином, амикацином, гентамицином, тобрамицином, неомицином, нетилмицином и канамицином.

Контроль качества проводимого исследования осуществляли с помощью контрольных штаммов *E.coli* ATCC 25218 и *P.aeruginosa* ATCC 27853.

Определение генов резистентности проводили методом спот-гибридизации по методу, описанному T.Gootz et al. (1985) с использованием фильтров Nep фирмы "Du Pont" (США). В качестве ДНК-зондов были использованы внутренние фрагменты генов, кодирующих следующие аминогликозид модифицирующие ферменты: ANT(2"), AAC(3)-V, APH(3')-I (полученные в Государственном научном центре по антибиотикам, г. Москва), а также использовались зонды ANT-2"-а, AAC-3-I, AAC-3-Va, AAC-3-Vb, AAC-2'-Ia, AAC-6'-Ib, AAC-6'-Ic, APH-3'-I, APH-3'-II, APH-3'-VI, ANT-4'-II, ANT-3", ANT-4'-I, APH-2"+6', APH-3'-III, AAC-3-IV, AAC-6'-Ia, ANT-6-Ia, AAC-3-Ib, AAC-6'-IIb, AAC-6'-If, r-RNA из коллекции института Schering-Plough (США).

Конъюгационную передачу R плазмид в реципиентный штамм *E.coli* K12 C 600 rif^r (F-, thi-1, thr-1, leuB6, lakY1, tonA21, supE44) проводили согласно методу,

описанному В. Low et al. (1965). Для отбора транскоњугантов после культивирования смесь высевали на среду, содержащую рифампицин и гентамицин. Отобранные транскоњуганты проверяли на перекрестную резистентность ко всем использованным в работе антибиотикам.

Выделение плазмидной ДНК проводили по методу Т. Eckhardt (1978), используя для разделения ДНК электрофорез в вертикальном 0.8% агарозном геле. Штаммы *Escherichia coli* Rp-4 и RI-19 из коллекции ГНЦА использовались как реперы для определения размеров плазмид.

Для элиминации плазмид к бактериальной культуре добавляли элиминирующий агент. После инкубации проводили высеv параллельно на чашки с агаром Mueller Hinton + гентамицин и без антибиотика. Для оценки эффективности элиминации отбирали по 200 колоний каждого клона.

Для анализа результатов использовались методы описательной статистики: частоты, проценты и процентное распределение.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты исследований выявили высокий процент резистентности аэробных грам(-) возбудителей госпитальных инфекций к гентамицину в стационарах России: в СОКБ - 74%, в КККБ - 69%, в ЦКБ - 58%, в ГКВГ - 46%. Резистентность к амикацину составила: в СОКБ - 6%, в КККБ - 1%, в ЦКБ - 10% и в ГКВГ - 29%.

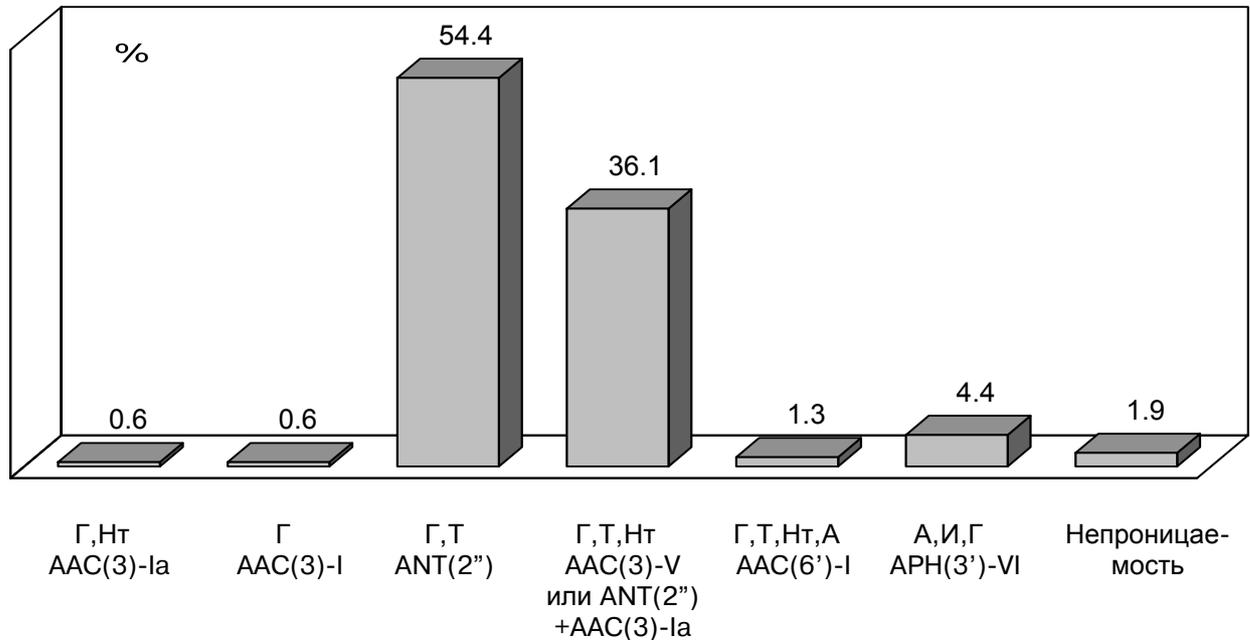
Всего было отобрано 312 устойчивых бактерий, из них в СОКБ - 158, в ГКВГ - 54, в ЦКБ - 41, в КККБ - 59. Основными возбудителями были представители семейства Enterobacteriaceae: в СОКБ - 101, в ГКВГ - 47, в ЦКБ - 16, в КККБ - 18; *P.aeruginosa*: в СОКБ - 36, в ГКВГ - 5, в ЦКБ - 19, в КККБ - 33; неферментирующие грам(-) бактерии *Acinetobacter* spp. и *Alcaligenes faecalis*: в СОКБ - 21, в ГКВГ - 2, в ЦКБ - 6, в КККБ - 8.

Проведенные исследования показали, что фармакодинамика аминогликозидов специфична для каждого из стационаров за счет особого сочетания ферментов, модифицирующих те или иные аминогликозиды. Причем было обнаружено 100% сходство результатов по определению ферментов как методом AGRP, так и методом ДНК-ДНК гибридизации.

Были выявлены фенотипы резистентности к аминогликозидам II и III поколений в исследованных стационарах.

В СОКБ основными фенотипами резистентности явились гентамицин-тобрамицин, гентамицин-тобрамицин-нетилмицин (Рис. 1).

Рисунок 1. Основные фенотипы резистентности к аминогликозидам II и III поколений в СОКБ



Как видно из представленных данных, преобладающие фенотипы были обусловлены продукцией ферментов ANT(2'') и AAC(3)-V. Достаточно редко (1,9%) встречалась резистентность ко всем аминогликозидам, обусловленная полной непроницаемостью клеточной стенки.

Большинство резистентных к аминогликозидам II поколения штаммов было устойчиво к канамицину и неомицину в результате выработки ферментов APH(3')-I и/или APH(3')-II. Так, из 87 штаммов, продуцирующих нуклеотидилтрансферазу ANT(2''), 56 (64,3%) одновременно вырабатывали APH(3')-I. Из 55 бактерий, вырабатывающих ацетилтрансферазу AAC(3)-V, 47 (85,5%) одновременно продуцировали фосфотрансферазу APH(3')-I. Эти данные свидетельствуют о нецелесообразности использования для лечения госпитальных грам(-) инфекций аминогликозидов I поколения как ввиду их высокой токсичности, так и в следствие высокого процента устойчивости к ним. Из аминогликозидов II поколения тобрамицин не имеет никаких преимуществ перед гентамицином ввиду перекрестной резистентности.

Фенотипы резистентности к аминогликозидам III поколения не распространены в СОКБ, поэтому амикацин целесообразно включать в больничный

формуляр и использовать для эмпирического лечения госпитальных инфекций в отделениях интенсивной терапии, а также при выявлении резистентности к гентамицину.

Выявлены различия в фенотипах резистентности у различных семейств грам(-) бактерий, а также в пределах одного семейства между родами. Так, у *P.aeruginosa* и *K.pneumoniae* преобладающим фенотипом резистентности был гентамицин-тобрамицин, обусловленный выработкой ANT(2^{''}) - 26/36 (72,2%) и 43/50 (86,0%), соответственно. Фенотип резистентности гентамицин-тобрамицин-нетилмицин (продукция AAC(3)-V) не был распространен у этих изолятов и составил 8/36 (22,2%) и 7/50 (14,0%), соответственно. Другие фенотипы устойчивости к аминогликозидам встречались лишь у отдельных изолятов (Таб. 1, 2).

Таблица 1. Механизмы резистентности к аминогликозидам у *P.aeruginosa*

Механизм резистентности		Фенотип резистентности	Количество
ANT(2 ^{''})		К, Г, Т	26/36 (72,2%)
	+ APH(3')-I	К, Г, Т, Н	15/26 (57,7%)
AAC(3)-V		Г, Т, Нт	8/36 (22,2%)
	+ APH(3')-I	К, Г, Т, Нт, Н	6/8
APH(3')-I		К, Н	1/36 (2,8%)
Непроницаемость		К, Н, Г, Т, Нт, А, И	1/36 (2,8%)

Таблица 2. Механизмы резистентности к аминогликозидам у *K.pneumoniae*

Механизм резистентности		Фенотип резистентности	Количество
ANT(2 ^{''})		К, Г, Т	43/50 (86,0%)
	+ APH(3')-I	К, Г, Т, Н	27/43 (62,8%)
	+ AAC(3)-V	К, Г, Т, Нт	1/43 (2,3%)
AAC(3)-V	+ APH(3')-I	К, Г, Т, Нт, Н	7/50 (14,0%)
	+ AAC(3)-I	К, Г, Т, Нт, Н	1/7

Полученные данные свидетельствуют о том, что, хотя по литературным данным, тобрамицин *in vitro* имеет несколько большую активность в отношении *P.aeruginosa* по сравнению с гентамицином, его нельзя использовать в СОКБ для лечения инфекций, вызванных этим микроорганизмом, так же как и *K.pneumoniae*. Решение об использовании нетилмицина для терапии инфекций, вызванных *P.aeruginosa* и *K.pneumoniae*, возможно только после определения чувствительности к этому антибиотику.

Преобладающим фенотипом резистентности у клинических изолятов *P.mirabilis* и *Enterobacter* spp., является гентамицин-тобрамицин-нетилмицин, который составил 27/34 (79,4%) и 9/11 (81,8%), соответственно. Фенотип резистентности гентамицин-тобрамицин встречался значительно реже у *P.mirabilis* и был выявлен у 6/34 (17,6%) штаммов, но отсутствовал у *Enterobacter* spp. (Таб. 3, 4).

Таблица 3. Механизмы резистентности к аминогликозидам у *P.mirabilis*

Механизм резистентности			Фенотип резистентности	Количество
ANT(2")			К, Г, Т	6/34 (17,6%)
	+ APH(3')-I		К, Г, Т, Н	5/6
AAC(3)-V			Г, Т, Нт	27/34 (79,4%)
	+ APH(3')-I		К, Г, Т, Нт, Н	25/27 (92,6%)
		+ APH(3')-II	К, Г, Т, Нт, Н	6/25 (24,0%)
Непроницаемость			К, Н, Г, Т, Нт, А, И	1/34 (2,9%)

Таблица 4. Механизмы резистентности к аминогликозидам у *Enterobacter* spp.

Механизм резистентности			Фенотип резистентности	Количество
AAC(3)-V			Г, Т, Нт	9/11 (81,8%)
	+ APH(3')-I		К, Г, Т, Нт, Н	7/9 (77,8%)
		+ ANT(2")	К, Г, Т, Нт, Н	1/9 (11,1%)
AAC(6')-I	+ APH(3')-I	+ AAC(3)-I	К, Г, Т, Нт, Н, А	2/9 (22,2%)

Согласно полученным данным, тобрамицин и нетилмицин не имеют никаких преимуществ перед гентамицином для лечения госпитальных инфекций, вызванных *Enterobacter* spp. и *P.mirabilis*. Для решения вопроса о возможности лечения амикацином инфекций, вызванных *Enterobacter* spp., необходимо проводить определение чувствительности к нему. Новый аминогликозид III поколения исепамицин в данном случае может быть препаратом выбора.

Бактерии рода *Acinetobacter* отличались по фенотипу резистентности от остальных возбудителей (Таб. 5). Наряду с распространенным у других грам(-) палочек фенотипом устойчивости гентамицин-тобрамицин [11/21 (52%)], 33,3% из них имели фенотип гентамицин-амикацин-исепамицин в результате продукции комбинации ферментов APH(3')-VI и AAC(3)-I.

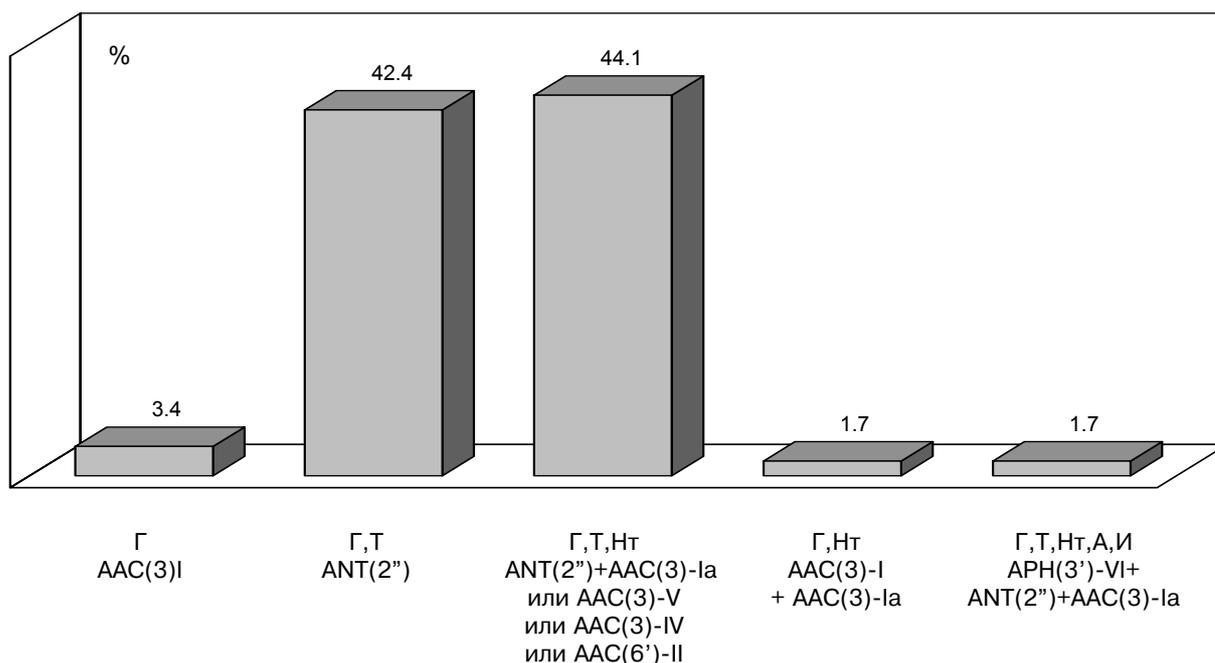
Таблица 5. Механизмы резистентности к аминогликозидам у *Acinetobacter* spp.

Механизм резистентности				Фенотип резистентности	Количество
ANT(2")				К, Г, Т	11/21 (52,4%)
	+ APH(3')-I			К, Г, Т, Н	9/11 (81,8%)
	+ AAC(3)-Ia	+ APH(3')-I		К, Г, Т, Нт,Н	1/11 (9,1%)
AAC(3)-V	+APH(3')-I			К, Н, Г, Т, Нт	1/21 (4,8%)
AAC(3)-I	+ AAC(3)-Ia	+APH(3')-I		К, Н, Г, Нт	1/21 (4,8%)
APH(3')-VI	+ AAC(3)-I	+ APH(3')-I	Снижение проницаем.	А, И, Г, К, Н	7/21 (33,3%)
Непроницаемость				К, Н, Г, Т, Нт, А, И	1/21 (4,8%)

Согласно полученным данным, наибольшую проблему при выборе аминогликозидов в СОКБ представляют инфекции, вызванные штаммами *Acinetobacter* spp. Учитывая, что все штаммы обладают резистентностью к канамицину, гентамицину и тобрамицину, не имеет смысла тестировать эти микроорганизмы к аминогликозидам I и II поколений, кроме нетилмицина. Амикацин можно использовать только при наличии данных антибиотикограммы. Препаратом выбора для терапии таких инфекций в СОКБ является нетилмицин.

Анализ данных, полученных в КККБ показал, что в этом стационаре преобладали фенотипы резистентности к аминогликозидам II поколения: гентамицин-тобрамицин, выявленный у 25/59 (42,4%) и гентамицин-тобрамицин-нетилмицин - у 26/59 (44,1%) штаммов (Рис. 2).

В таблице 6 показано, что в КККБ не было штаммов с перекрестной резистентностью к аминогликозидам всех поколений за счет полной непроницаемости клеточной стенки. Имелись единичные случаи монорезистентности к гентамицину и к аминогликозидам III поколения. Выявлены не встречавшиеся в других стационарах ферменты, обуславливающие перекрестную резистентность к аминогликозидам II поколения: AAC(3)-IV и AAC(6')-II. Большинство исследованных грам(-) возбудителей госпитальных инфекций характеризовалось одновременной устойчивостью к аминогликозидам I поколения.

Рисунок 2. Фенотипы резистентности к аминогликозидам в КККБ**Таблица 6. Механизмы резистентности у грам(-) бактерий в КККБ**

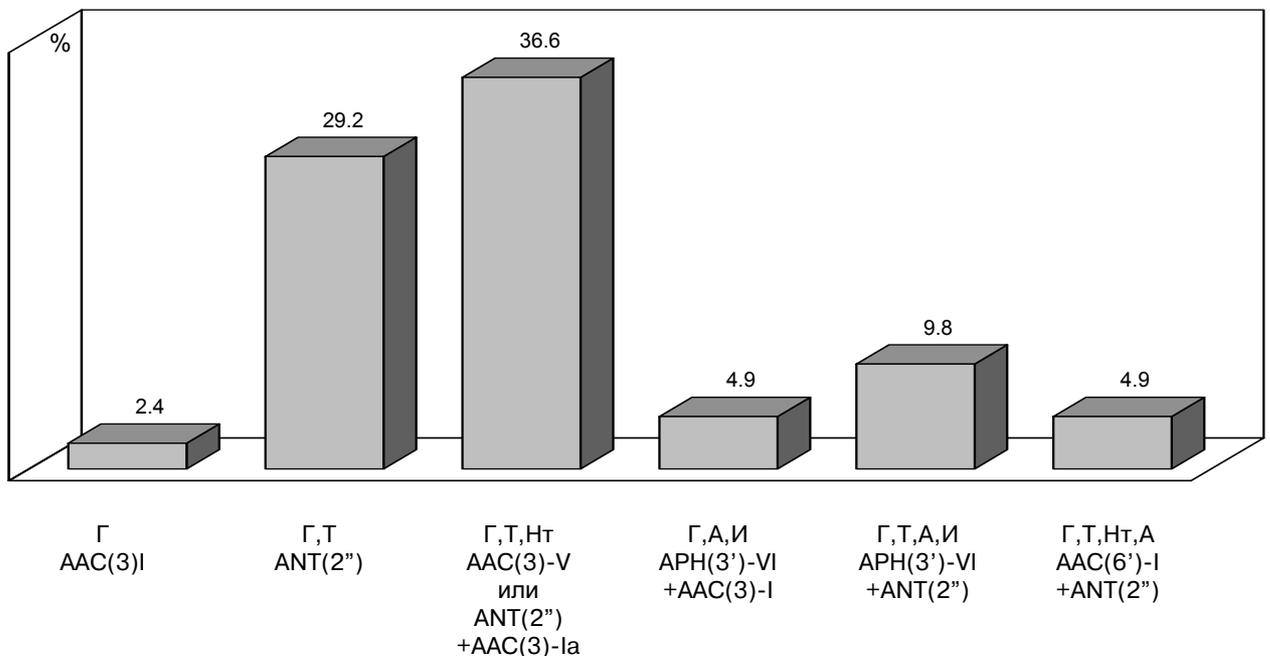
Механизм резистентности				Фенотип резистентности	Количество
ANT(2")				К, Г, Т	28/59 (47,5%)
	+ APH(3')-I и/ или APH(3')-II			К, Н, Г, Т	26/28 (92,9%)
	+ APH(3')-I	+ AAC(3)-Ia		К, Н, Г, Т, Нт	3/26 (11,5%)
			+ AAC(3)-I	К, Н, Г, Т, Нт	1/3
			+ APH(3')-VI	К, Н, Г, Т, Нт, А, И	1/3
AAC(3)-V	+ APH(3')-I и/ или APH(3')-II			К, Н, Г, Т, Нт	20/59 (33,9%)
AAC(3)-I	+ APH(3')-II			К, Н, Г	2/59 (3,4%)
AAC(3)-I	+ AAC(3)-Ia	+ APH(3')-I		К, Н, Г, Нт	1/59 (1,7%)
AAC(3)-IV				Г, Т, Нт	2/59 (3,4%)
AAC(6')-II	+ APH(3')-II			К, Н, Г, Т, Нт	2/59 (3,4%)
APH(3')-II				К, Н	4/59 (6,8%)

Таким образом, исходя из полученных данных, в больничный формуляр в КККБ целесообразно включать гентамицин, нетилмицин и амикацин. Амикацин можно использовать для проведения эмпирической терапии госпитальных

инфекций, а также при выявлении возбудителей, резистентных к гентамицину. Нет необходимости рутинно определять чувствительность к канамицину, тобрамицину и исепамицину и включать эти препараты в больничный формуляр.

В ЦКБ основными фенотипами резистентности были гентамицин-тобрамицин и гентамицин-тобрамицин-нетилмицин, определенные у 29,2% и 36,6% клинических изолятов, соответственно. Были выявлены фенотипы устойчивости к аминогликозидам III поколения. Монорезистентность к гентамицину отмечалась в единичных случаях. Перекрестной резистентности к аминогликозидам всех поколений за счет полной непроницаемости клеточной стенки в ЦКБ не наблюдали (Рис. 3).

Рисунок 3. Фенотипы резистентности к аминогликозидам в ЦКБ



В ЦКБ, также как и в других стационарах, отмечен высокий процент одновременной резистентности к аминогликозидам I поколения за счет продукции фосфотрансфераз APH(3')-I и/или APH(3')-II (Таб. 7).

Таблица 7. Механизмы резистентности у грам(-) бактерий в ЦКБ

Механизм резистентности				Фенотип резистентности	Количество
AAC(3)-V				Г, Т, Нт	13/41(31,7%)
	+ APH(3')-I или APH(3')-II			К, Г, Т, Нт, Н	9/13 (69,2%)
	+ APH(3')-I или APH(3')-II	+ ANT(2'')		К, Г, Т, Нт, Н	2/13 (15,4%)
		+ ANT(2'')		К, Г, Т, Нт	1/13 (7,7%)
ANT(2'')				К, Г, Т	14/41(34,1%)
	+ APH(3')-I или APH(3')-II			К, Н, Г, Т	10/14 (71,4%)
	+ AAC(3)-Ia			К, Г, Нт, Т	1/14 (7,1%)
	+ AAC(3)-Ia	+ APH(3')-I		К, Н, Г, Нт, Т	1/14 (7,1%)
APH(3')-VI	+ AAC(3)-I	+ APH(3')-II		К, Н, Г, А, И	2/41 (4,9%)
	+ AAC(3)-Ia	+ APH(3')-I	+ ANT(2'')	К, Н, Г, Т, А, И	4/41 (9,8%)
AAC(6')-I	+ ANT(2'')	+ APH(3')-I		К, Н, Г, Т, Нт, А	2/41 (4,9%)
AAC(3)-I	+ APH(3')-II			Г, К, Н	1/41 (2,4%)
APH(3')-I				К, Н	5/41 (12,2%)

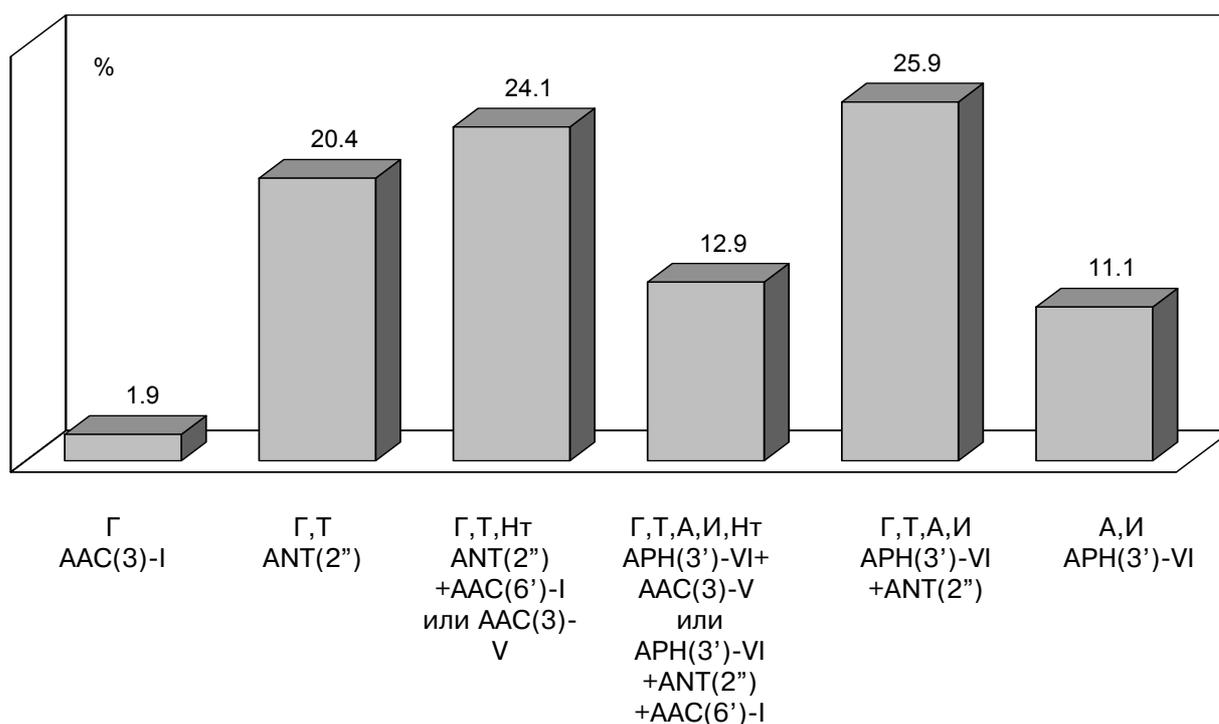
Проведенные в ЦКБ исследования показали, что при назначении аминогликозидов в случае резистентности возбудителя к гентамицину, нельзя использовать тобрамицин. Параллельно с гентамицином штаммы необходимо тестировать на чувствительность не к тобрамицину, а к нетилмицину. Ввиду резистентности всех штаммов *P.aeruginosa* и *Acinetobacter* spp. к гентамицину и частой перекрестной устойчивости к аминогликозидам II и III поколений, при выделении из клинического материала этих возбудителей целесообразно определять их чувствительность к нетилмицину и амикацину.

Результаты исследования в ГВКГ показали, что основным фенотипом резистентности является амикацин-исепамицин, выявленный у 48,1% клинических изолятов, что обусловлено продукцией фосфотрансферазы APH(3')-VI. Причем 53,8% из них были устойчивы к гентамицину и тобрамицину, а 23,1% - к гентамицину, тобрамицину и нетилмицину в результате одновременной продукции аденилилтрансферазы ANT(2'') и ацетилтрансферазы AAC(3)-V, соответственно (Таб. 8).

Таблица 8. Механизмы резистентности у грам(-) бактерий в ГВКГ

Механизм резистентности				Фенотип резистентности	Количество
APH(3')-VI				К, А, И	26/54 (48,1%)
	+ ANT(2'')			К, Г, Т, А, И,	14/26 (53,8%)
		+ APH(3')-I		К, Н, Г, Т, А, И	7/14 (50,0%)
		+ AAC(6')-I		К, Н, Г, Т, Нт, А, И	1/14 (7,1%)
	+ AAC(3)-V			К, Г, Т, А, И Нт,Н	6/26 (23,1%)
		+AAC(3)-I	+APH(3')-I	К, Н, Г, Т, Нт, А, И	2/6
AAC(3)-V	+APH(3')-I			К, Н, Г, Т, Нт	12/54 (22,2%)
ANT(2'')				К, Г, Т	12/54 (22,2%)
	+ AAC(6')-I			К, Г, Т, Нт	1/2
AAC(3)-I				Г	1/54 (1,9%)
APH(3')-I				К, Н	1/54 (1,9%)
Непрониц. клеточной оболочки				К, Н, Г, Т, Нт, А, И	2/54 (3,7%)

Резистентность ко всем аминогликозидам за счет полной непроницаемости клеточной оболочки не распространена (3,7%) у клинических изолятов в ГВКГ. Монорезистентность к гентамицину выявлена у 1 госпитального штамма. Фенотипы устойчивости гентамицин-тобрамицин и гентамицин-тобрамицин-нетилмицин наблюдали у 20,4% и 24,1% грам(-) бактерий, соответственно (Рис. 4).

Рисунок 4. Фенотипы резистентности к аминогликозидам в ГВКГ

Выявленные у клинических изолятов в ГВКГ механизмы резистентности, свидетельствуют о невозможности проведения эмпирической терапии аминогликозидами в этом стационаре. Этиотропную терапию можно проводить лишь при наличии результатов определения чувствительности выделенного патогена к конкретному аминогликозиду. В наборе для определения чувствительности, а также для включения в больничный формуляр, достаточно иметь нетилмицин, гентамицин и амикацин.

Способность к конъюгативной передаче плазмид, содержащих в своем составе гены резистентности к аминогликозидам, значительно осложняет терапию госпитальных инфекций. Результаты экспериментов по конъюгативной передаче R-плазмид в реципиентный штамм *E.coli* С 600 представлены в таблице 9. В процессе конъюгации детерминанты резистентности к гентамицину передавались не только между представителями одного семейства *Enterobacteriaceae*, но и между представителями разных семейств, например, от штаммов *P. aeruginosa*. Тем не менее, не было отмечено ни одного случая передачи резистентности к гентамицину у штаммов *Acinetobacter* spp.

Таблица 9. Способность к конъюгативной передаче резистентности у исследованных штаммов

Штаммы	Общее количество исследованных штаммов	Количество штаммов, способных к передаче резистентности при конъюгации
<i>Klebsiella</i> spp.	19	7/19 (36,8%)
<i>Pseudomonas</i> spp.	19	6/19 (31,6%)
<i>Acinetobacter</i> spp.	14	0/14 (0%)
<i>Proteus</i> spp.	11	2/11 (18,2%)
<i>Enterobacter</i> spp.+ <i>Citrobacter</i> spp.	8	8/8 (100%)
Всего:	71	23/71 (32,4%)

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что разработать единую схему терапии госпитальных грам(-) инфекций аминогликозидными антибиотиками для всех стационаров практически невозможно, тем более нельзя использовать в Российских стационарах больничные формуляры, разработанные в других странах. Задача каждого учреждения создать свой перечень эффективных препаратов этой группы для лечения госпитальных грам(-) инфекций.

ВЫВОДЫ

1. Основными грам(-) возбудителями госпитальных инфекций в многопрофильных стационарах различных регионов России являются микроорганизмы семейства Enterobacteriaceae: *Enterobacter* spp., *K.pneumoniae*, *P.mirabilis*; и неферментирующие грам(-) бактерии: *Acinetobacter* spp. и *P.aeruginosa*.
2. В Российских стационарах грам(-) возбудители госпитальных инфекций имеют высокий уровень резистентности к канамицину и гентамицину, а в ГВКГ - и к амикацину
3. Устойчивость госпитальных штаммов грам(-) бактерий к аминогликозидам преимущественно обусловлена их инаktivацией комплексом специфических ферментов. Наиболее распространенными типами аминогликозид-модифицирующих ферментов являются ANT(2"), AAC(3)-V и APH(3')-I, что обуславливает наличие ГТ (гентамицин-тобрамицин), ГТНт (гентамицин-тобрамицин-нетилмицин) и КН (канамицин-неомицин) фенотипов резистентности.
4. Впервые в России выявлены ферменты, обуславливающие резистентность к амикацину. Основным из них является APH(3')-VI, одновременно модифицирующий исепамицин.
5. В отечественных стационарах резистентность к аминогликозидам, связанная с нарушением транспорта антибиотиков в бактериальную клетку, не имеет существенного клинического значения.
6. Гены, детерминирующие резистентность к аминогликозидам, передаются при конъюгации от устойчивых бактерий к чувствительным, причем не только в пределах одного семейства, но и между представителями разных семейств, что существенно осложняет лечение госпитальных инфекций.
7. При выборе аминогликозидов для лечения госпитальных грам(-) инфекций следует учитывать их фармакодинамику, которая специфична для каждого стационара и зависит от преобладающих механизмов резистентности.

Научно-практические рекомендации

Для врачей-бактериологов:

1. В стационарах с резистентностью грам(-) микрофлоры к амикацину следует проводить определение чувствительности к гентамицину, нетилмицину и амикацину. Тобрамицин и исепамицин нецелесообразно включать в наборы для лабораторного тестирования.
2. Информировать клиницистов о результатах тестирования следует избирательно: при чувствительности грам(-) бактерий к гентамицину не следует выдавать результат определения чувствительности к другим аминогликозидам.
3. В стационарах, где не регистрировалась резистентность к амикацину, его целесообразно включать его в набор для тестирования с периодичностью один раз в 6-12 месяцев с целью выявления первых случаев устойчивости.
4. Следует периодически проводить фармакодинамический мониторинг механизмов устойчивости госпитальной грам(-) микрофлоры с целью выявления преобладающих фенотипов резистентности.

Для клинических фармакологов и клиницистов других специальностей:

1. Не рекомендуется использовать в Российских стационарах больничные формуляры по антибактериальной терапии из других стран, ввиду особенностей резистентности к аминогликозидам в отечественных стационарах.
2. В больничном формуляре достаточно иметь гентамицин, нетилмицин и амикацин; нецелесообразно включать канамицин, тобрамицин, исепамицин.
3. В СОКБ, ЦКБ и КККБ возможно эмпирическое использование амикацина для лечения инфекций в качестве препарата выбора в отделениях интенсивной терапии, а также при выявлении резистентности к гентамицину.
4. В ГКВГ аминогликозиды целесообразно исключить из схем эмпирической терапии госпитальных грам(-) инфекций, ввиду широкого распространения фенотипов резистентности к препаратам всех поколений.

Список научных работ, опубликованных по теме диссертации

1. Vakulenko S., Kolganov A., Krotova L., Stratchunsky L., Reshedko G. Aminoglycoside Resistance of Clinical Isolates from Two Russian Regions // 18-th International Congress of Chemotherapy. Stockholm. - 1993, - P. 191.
2. Stratchounsky L., Reshedko G., Vakulenko S., Kolganov A. Aminoglycoside Resistance Mechanisms in Clinical Strains of Gram-negative Bacteria from Smolensk Regional Hospital // 1st Scientific Meeting of the European Society for Chemotherapy. Budapest. -1993, - P. 95.
3. Reshedko G., Vakulenko S., Sidorenko S., Krotova L., Stratchounsky L. Profile of Aminoglycoside Modifying Enzymes in Two Region of Russia // 6th International Congress for Infectious Diseases. Prague. - 1994, - P. 77.
4. Страчунский Л.С., Решедько Г.К., Кречикова О.И., Стецюк О.У., Завадкин А.В., Богданович Т.М. Резистентность госпитальных штаммов *K. pneumoniae* в отделениях интенсивной терапии // II Российский национальный конгресс "Человек и лекарство": Тез. докл. - М., 1995. - С. 184.
5. Stratchounsky L., Reshedko G., Krechikova O., Stetsuk O., Dekhnich A. The Survey of Resistance in *K. pneumoniae* // Can. J. Infect. Dis. - 1995. - V. 6. -Suppl. C. - P. 472C.
6. Решедько Г.К., Страчунский Л.С. Механизмы резистентности к аминогликозидам и их значение для клинической практики // III Российский национальный конгресс «Человек и лекарство»: Тез. докл. - М., 1996. - С. 193.
7. Reshedko G., Stetsuk O., Bogdanovich T., Dekhnich A. Klebsiella pneumoniae: Problem of Resistance // Alpe Adria Microbiol. J. - 1996. - V. 5. - N. 1. - P. 69-72.
8. Решедько Г.К., Стецюк О.У., Богданович Т.М. Анализ структуры резистентности к аминогликозидам у *A. anitratus* // Актуальные вопросы современной биологии и медицины: Сб. научн. трудов / Под ред. В.А. Правдивцева. - Смоленск. 1996. - С. 168-170.
9. Решедько Г.К., Некрасова Л.М., Стецюк О.У., Богданович Т.М. Опыт использования E-тестов при определении чувствительности к антибиотикам грамотрицательной микрофлоры // Материалы VII съезда Всероссийского общества эпидемиологов, микробиологов и паразитологов: Тез. докл. - М., 1997. Т. 2. - С. 360-361.

10. Stratchounsky L., Krechikova O., Reshedko G. et al. Antimicrobial Resistance of Nosocomial Gram-Negative Pathogens in Intensive Care Units in Russia // 5-th Scientific Meeting of ESC, - St.-Petersburg. - 1997, - P. 34.
11. Reshedko G., Stratchunsky L., Vakulenkov S., Kettner M., Schindler J., Horinova V., Miller G. H., Hare R. S., Naples L., Sabatelli F.J., Shaw K.J. Aminoglycoside Resistance Mechanisms in Isolates from Russia, Slovakia, and the Czech Republic // 37-th ICAAC Conference. Toronto. - 1997.- P. 51.
12. Решедько Г.К. Аминогликозиды: спектр активности и клиническое значение // Республ. науч.-практ. семинар.: Тез. докл. - Казань, 1997.- С. 39-47.