

УДК 579.222.044:577.181

Значение ферментативной модификации аминогликозидов в развитии резистентности у бактерий

Г.К. Решедько

Смоленская государственная медицинская академия

Аминогликозиды являются группой антибактериальных препаратов, широко используемых в клинической практике для лечения инфекционных болезней. Однако их применение сопряжено с рядом проблем: токсичностью, фармакокинетическими особенностями и резистентностью микроорганизмов. В настоящей работе рассматриваются механизмы устойчивости возбудителей инфекций к аминогликозидам, клиническое значение основного механизма резистентности – ферментативной модификации молекулы аминогликозидных антибиотиков.

Ключевые слова: антибиотики, аминогликозиды, антибиотикорезистентность.

Роль аминогликозидов в клинической практике

В настоящее время, несмотря на большой арсенал антибактериальных препаратов, *аминогликозиды* по-прежнему являются важной группой лекарственных средств, широко используемых в терапии разнообразных инфекций.

Различают 3 поколения аминогликозидов.

Аминогликозиды первого поколения – стрептомицин, неомицин, канамицин и мономицин – вследствие их токсичности применяют только для терапии специфических инфекций (туберкулез, зоонозные и особо опасные инфекции).

Основное клиническое значение имеют аминогликозиды второго и третьего поколений.

Ко второму поколению аминогликозидов относят гентамицин, тобрамицин, сизомицин и нетилмицин.

В третье поколение аминогликозидов входят амикацин и исепамицин. Спектр их активности включает аэробные грамотрицательные бактерии: представители семейства *Enterobacteriaceae*, *Acinetobacter* spp. и *Pseudomonas* spp. Поэтому они применяются для лечения тяжелых системных, в том числе нозокомиальных, инфекций: бактериемии, вторичного бактериального менингита, нозокомиальных пневмоний, особенно у пациентов, находящихся на искусственной вентиляции легких, а также с иммунодефицитными состояниями, осложненных инфекциях мочевыводящих путей.

Иногда аминогликозиды используют для лечения стафилококковых инфекций, в случаях, когда другие, менее токсичные, антибактериальные препараты недоступны или противопоказаны, а также если инфекция вызвана ассоциацией стафилококка и грамотрицательных бактерий.

Особое положение занимают генерализованные инфекции или инфекционные эндокардиты, вызванные энтерококками. В этих случаях используют аминогликозид первого поколения – стрептомицин или второго поколения – гентамицин в комбинации с бета-лактамами антибиотиками (пенициллин или ампициллин) или гликопептидами (ванкомицин или тейкопланин).

Существует ряд аминогликозидных антибиотиков, которые в настоящее время не используются в клинической практике в России, но применяются для лабораторной диагностики и в ветеринарии (ливидомицин, рибостамицин, бутирозин, апрамицин, дибекацин, 2'-N-этилнетилмицин, 6'-N-этилнетилмицин, фортимицин).

Применение аминогликозидов в клинической практике сопряжено с рядом проблем: их токсичностью, фармакокинетическими особенностями, а также развитием и распространением приобретенной резистентности.

Контактный адрес:

Решедько Галина Константиновна

214019, Смоленск, а/я 5

Факс: (0812) 55-0624

Эл. почта: galina@cliph.keytown.com

Механизмы устойчивости бактерий к аминогликозидам

Проблема широкого распространения устойчивости клинически значимых микроорганизмов к аминогликозидам возникла в середине 60-х годов. В последующие годы она стала приобретать все большее значение. Практически у всех природно чувствительных к аминогликозидам возбудителей инфекций может развиваться к ним устойчивость. Существуют три механизма резистентности к аминогликозидам [1, 4, 7].

1. Снижение или прекращение транспорта антибиотиков внутрь бактериальной клетки [4]. Для этого типа устойчивости характерна перекрестная резистентность ко всем аминогликозидам, хотя уровень устойчивости может быть незначительным. Причем микробные клетки с нарушенной системой транспорта антибиотиков имеют тенденцию к метаболическим нарушениям и отличаются медленным ростом.

Известно, что природная резистентность к аминогликозидам, обусловленная отсутствием системы электронного транспорта, характерна для облигатных анаэробов. Низкая активность электронной транспортной цепи является причиной сниженной чувствительности к аминогликозидам факультативных анаэробов [14]. Приобретенная резистентность к аминогликозидам, обусловленная снижением электронного транспорта, часто наблюдается у *P. aeruginosa*, реже – у представителей семейства Enterobacteriaceae [5]. В отношении таких штаммов аминогликозиды могут быть эффективны только при использовании высоких доз.

Кроме того, было показано, что низкие уровни резистентности к аминогликозидам у микроорганизмов могут быть обусловлены мутациями, изменяющими липополисахаридный состав клеточной стенки бактерий [5]. Такой тип резистентности, по видимому, обусловлен уменьшением числа потенциальных участков связывания липополисахаридов с положительно заряженными аминогруппами в составе аминогликозидов.

К резистентности могут также приводить мутации генов, кодирующих пуриновые белки внешней мембраны грамотрицательных бактерий. Однако этот механизм встречается значительно реже, чем изменения липополисахаридов или системы электронного транспорта [5].

2. Изменение мишеней действия аминогликозидов – рибосом. Этот механизм характерен для стрептомициноустойчивых микроорганизмов, у которых рибосомы в результате модификации белков 30S субъединицы теряют способность связывать

стрептомицин [4]. Более детальные исследования показали, что устойчивость к стрептомицину обусловлена мутациями гена *grsL*, кодирующего белок 12S. Имеются также сообщения о резистентности к гентамицину, вызванной структурными изменениями белка 50S [4].

3. Ферментативная модификация молекулы антибиотика является наиболее распространенным механизмом резистентности у штаммов бактерий. Различают три вида аминогликозидмодифицирующих ферментов (АГМФ): ацетилтрансферазы, фосфотрансферазы и аденилилтрансферазы, или нуклеотидилтрансферазы [1].

Ацетилтрансферазы (принятое сокращение ААС) модифицируют аминогруппу молекулы аминогликозида, фосфотрансферазы (АРН) и аденилилтрансферазы (АНТ) действуют на гидроксильную группу. Действие АГМФ (соответственно ацетилирование, фосфорилирование и аденилирование) приводит к такому изменению структуры молекулы антибиотика, которое не позволяет ему связываться с бактериальной рибосомой, в результате чего синтез белка не ингибируется и бактериальная клетка сохраняет жизнеспособность [1, 5].

В настоящее время можно считать доказанным, что невозможно синтезировать аминогликозид, не подвергающийся инактивации бактериальными ферментами, так как существует определенная связь между наличием в молекуле антибиотика модифицируемых функциональных групп и его антибактериальной активностью.

Показано, что для работы ацетилтрансфераз в качестве ко-фактора необходим ацетил-коА, а донором остатков фосфорной или адениловой кислот при действии фосфо- или аденилилтрансфераз является аденозинтрифосфат (АТФ).

АГМФ локализуются в цитоплазме, а также в периплазматическом пространстве у грамотрицательных бактерий [5, 7]. Сводные данные об АГМФ представлены в табл. 1 и 2.

Как следует из данных табл. 1 и 2, у грамотрицательных и грамположительных микроорганизмов три функциональные группы молекулы аминогликозида могут подвергаться ацетилированию тем или иным из описанных ферментов, две – аденилированию; фосфорилированию может подвергаться одна функциональная группа ферментами грамотрицательных бактерий и две – ферментами грамположительных бактерий. Ацетируются только аминогруппы, замещению остатками фосфорной и адениловой кислот подвергаются только гидроксильные группы. Пока у резистентных к антибиотикам клинически значимых бактерий не обнару-

Таблица 1. Типы ферментативной модификации аминогликозидов у грамотрицательных бактерий

Тип модификации	Фермент	Модифицируемая группа	Основные субстраты (аминогликозиды)
Фосфорилирование	APH(3')-I	3'-ОН	Канамицин, неомицин
	APH(3')-II	3'-ОН	Канамицин, неомицин
Ацетилирование	AAC(2')	2'-NH ₂	Гентамицин, тобрамицин, нетилмицин, неомицин
	AAC(6')-I	6'-NH ₂	Тобрамицин, нетилмицин, канамицин, амикацин
	AAC(6')-II	6'-NH ₂	Канамицин, гентамицин, тобрамицин, неомицин
	AAC(3)-I	3-NH ₂	Гентамицин
	AAC(3)-II	3-NH ₂	Гентамицин, тобрамицин, нетилмицин, канамицин
	AAC(3)-III	3-NH ₂	Гентамицин, тобрамицин, канамицин
	AAC(3)-IV	3-NH ₂	Тобрамицин, гентамицин, нетилмицин
	AAC(3)-VI	3-NH ₂	Гентамицин, тобрамицин, нетилмицин, канамицин
Аденилирование	ANT(4')-II	4'-ОН	Тобрамицин, канамицин, амикацин, исепамицин
	ANT(2'')-I	2''-ОН	Гентамицин, тобрамицин, канамицин

Таблица 2. Типы ферментативной модификации аминогликозидов у грамположительных бактерий

Тип модификации	Фермент	Модифицируемая группа	Основные субстраты (аминогликозиды)
Фосфорилирование	APH(3')-III	3'-ОН	Канамицин, неомицин, амикацин, исепамицин, стрептомицин
Ацетилирование + фосфорилирование	AAC(6') + APH(2'')	6'-NH ₂ + 2''-ОН	Гентамицин, тобрамицин, неомицин, нетилмицин, амикацин, исепамицин
Аденилирование	ANT(6')	6'-ОН	Стрептомицин
	ANT(4')-I	4'-ОН	Тобрамицин, канамицин, неомицин, амикацин, исепамицин

жено способности к N-фосфорилированию и O-ацетилированию аминогликозидов, хотя ферменты такого типа выявлены у микроорганизмов, продуцирующих эти антибиотики.

Разнообразие встречающихся у клинических штаммов микроорганизмов АГМФ может быть проиллюстрировано на примере их действия на молекулу канамицина (см. рисунок).

Практически каждый АГМФ может быть представлен несколькими изоферментами. Изоферменты кодируются генами, имеющими различную первичную структуру ДНК. Они отличаются между собой по спектру модифицируемых субстратов и могут входить в состав транспозонов и плазмид [4, 17, 24, 36, 37, 41].

Аминогликозидфосфотрансферазы

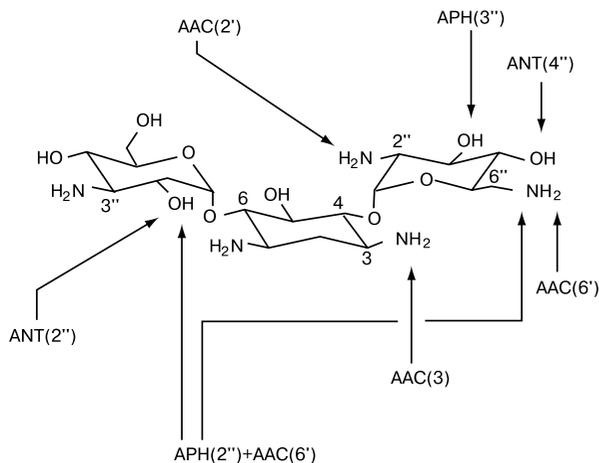
Аминогликозидфосфотрансферазы (APH) – это ферменты, модифицирующие аминогликозидные антибиотики путем фосфорилирования их гидроксильных групп в присутствии АТФ в качестве кофактора. В большей или меньшей степени изучен ряд APH, продуцируемых как грамотрицательными, так и грамположительными микроорганизмами [30, 36, 43].

В зависимости от положения гидроксильной группы антибиотика, модифицируемой ферментом, различают 5 типов фосфотрансфераз:

- APH(3');
- APH(3'');
- APH(6);
- APH(4);
- APH(2'') – в составе бифункционального фермента AAC(6')+APH(2'').

Наибольшее клиническое значение имеет фермент APH(3'), распространенный у грамотрицательных бактерий и обуславливающий резистентность к аминогликозидам разных поколений [36].

Фосфотрансферазы, модифицирующие стрептомицин, изучены менее других АГМФ, что, вероятно, связано с утратой клинического значения стрептомицина в лечении большинства инфекционных заболеваний. Различные изоферменты фосфотрансферазы APH(6) обнаружены как у клинических штаммов *P. aeruginosa* и *E. coli*, так и у штамма продуцента стрептомицина – *Streptomyces griseus* [36]. Другая инактивирующая стрептомицин фосфотрансфераза – APH(3'') – обнаружена у энтеробактерий и *P. aeruginosa*, а также у *S. griseus* [36].



Структура и ферментативная модификация молекулы канамицина: стрелками указаны шесть функциональных групп, подвергшихся ферментативной модификации

Особое положение занимает фермент APH(2''), обнаруженный только у грамположительных кокков – энтеро- и стафилококков [30, 36, 43]. Замечено, что все штаммы, вырабатывающие этот фермент, одновременно продуцировали ацетилтрансферазу AAC(6'). Позднее было установлено, что микроорганизмы продуцируют один бифункциональный фермент с молекулярной массой около 56 000, обладающий как фосфотрансферазной, так и ацетилтрансферазной активностью [1, 23].

В экспериментах по субклонированию удалось разделить участки гена, кодирующие фосфотрансферазу APH(2'') и ацетилтрансферазу AAC(6'), и показать, что фосфотрансфераза обуславливает резистентность к канамицину, гентамицину и тобрамицину, а ацетилтрансфераза – к канамицину, тобрамицину, нетилмицину, амикацину и исепамицину.

Наиболее значительную группу фосфотрансфераз составляет фермент APH(3') [36], представленный 7 изоферментами: APH(3')-I – APH(3')-VII, кодируемыми соответствующими генами: arhA1 – arhA7.

У грамотрицательных микроорганизмов наиболее распространенным является фермент APH(3')-I, обуславливающий резистентность к канамицину, неомицину, мономицину и ливидомицину. Этот фермент обнаружен у представителей семейства Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp., *Acinetobacter* spp. Широкому распространению кодирующего этот фермент гена способствовала его локализация в составе различных транспозонов: Tn903, Tn6 (Tn 2680), Tn 1525, Tn 1699, Tn 2350, Tn 4350 [1, 36].

Фосфотрансфераза APH(3')-II также обнаружена у различных представителей семейства

Enterobacteriaceae и *Pseudomonas* spp. Фермент модифицирует такие антибиотики, как канамицин, неомицин, мономицин, рибостамицин, бутирозин.

Определена нуклеотидная последовательность гена arhA2, входящего в состав транспозона Tn 5. Несмотря на локализацию гена фосфотрансферазы APH(3')-II в составе транспозона, этот фермент гораздо реже встречается у резистентных к аминогликозидам грамотрицательных бактерий, чем фермент APH(3')-I [36].

APH(3')-III, обуславливающий резистентность к канамицину, неомицину, ливидомицину, бутирозиону, обнаружен у штаммов грамположительных бактерий и *Campylobacter* spp. [18]. Продуцирующие этот фермент штаммы имеют низкий уровень резистентности *in vitro* к амикацину и исепамицину. Стафилококки, вырабатывающие фосфотрансферазу APH(3')-III, обладают устойчивостью к стрептомицину.

Фосфотрансферазы APH(3')-IV и APH(3')-V обнаружены у штаммов *Bacillus circulans* и *Streptomyces* spp. соответственно. У клинических изолятов бактерий эти ферменты не обнаружены [36].

Фосфотрансфераза APH(3')-VI обнаружена преимущественно у *Acinetobacter baumannii*, роль которых в этиологии нозокомиальных инфекций постоянно возрастает [10], и реже – у представителей семейства Enterobacteriaceae [36]. Этот фермент обеспечивает резистентность к канамицину и к структурно близким антибиотикам, включая амикацин и исепамицин [10].

Аминогликозидацетилтрансферазы

Аминогликозидацетилтрансферазы (AAC) ацетилируют аминогруппы молекулы аминогликозидов в присутствии ацетил-КоА в качестве ко-фактора. Известны 4 типа этих ферментов: AAC(6'), AAC(2'), AAC(3) и AAC(1). Они характеризуются тем, что способны инактивировать современные аминогликозидные антибиотики [36].

Ацетилтрансфераза AAC(2') обнаружена преимущественно у штаммов *Providencia* spp. и *Proteus* spp. [6, 36]. В зависимости от профиля резистентности к различным аминогликозидам различают два изофермента: AAC(2')-а, обеспечивающего устойчивость к 6'-N-этилнетилмицину и AAC(2')-b, вызывающего дополнительно резистентность к гентамицину, тобрамицину, нетилмицину, сизомицину и дибекацину.

Ацетилтрансфераза AAC(1) является вторым из известных к настоящему времени ферментов, способных модифицировать апрамицин. Этот фермент

обуславливает также резистентность к неомицину и паромомицину при сохранении активности канамицина, гентамицина, тобрамицина и амикацина [22]. Фермент обнаружен только у штаммов *E. coli*, выделенных у животных.

Большое количество изоферментов существует среди ацетилтрансфераз, модифицирующих функциональные группы аминогликозидных антибиотиков в положениях 6' и 3.

Продукция ацетилтрансферазы AAC(6')-I (согласно другой классификации AAC(6')-IV) является наиболее частой причиной резистентности к амикацину у грамотрицательных микроорганизмов: энтеробактерий и псевдомонад [8, 36], а также у *Acinetobacter haemolyticus* [19]. Кроме амикацина ферменты AAC(6')-I способны ацетилировать такие аминогликозидные антибиотики, как тобрамицин, сизомицин, нетилмицин, 2'-N-этилнетилмицин, дибекацин, канамицин [29, 35]. Недавно обнаруженный у штаммов *Citrobacter freundii* новый ген резистентности aac(6')-In обуславливает также резистентность к исепамицину [42].

В отличие от изофермента AAC(6')-I изофермент типа AAC(6')-II не модифицирует амикацин и исепамицин, но эффективно инактивирует гентамицин. Он обнаружен у штаммов *Pseudomonas* spp. [29, 32].

Ацетилтрансферазы, относящиеся к типу AAC(3), ацетируют 3-аминогруппу молекулы аминогликозидных антибиотиков. Изучены 11 изоферментов: AAC(3)-I, AAC(3)-Ia и AAC(3)-II – AAC(3)-X, различающихся по субстратному профилю [28, 36, 41].

Ферменты AAC(3)-Ia и AAC(3)-III обнаружены у штаммов *P. aeruginosa*, *Acinetobacter* spp. [40]. Фермент AAC(3)-II широко распространен у штаммов *Acinetobacter* spp. [9] и представителей семейства Enterobacteriaceae.

Штаммы, продуцирующие фермент AAC(3)-I, характеризуются резистентностью к гентамицину и фортомицину при сохранении чувствительности ко всем остальным аминогликозидам.

Фермент AAC(3)-III обнаружен у *P. aeruginosa*. Он обуславливает устойчивость к гентамицину, тобрамицину, дибекацину и канамицину. Ацетилтрансфераза AAC(3)-IV выявлена у разных микроорганизмов, выделенных у животных, и у клинических штаммов *E. coli* [16]. Самым распространенным у клинических штаммов бактерий является фермент AAC(3)-V, согласно другой номенклатуре AAC(3)-II, который определяет резистентность к гентамицину, тобрамицину, дибекацину, нетилмицину и канамицину. Он выявлен у представителей семейства Enterobacteriaceae, *Pseudomonas* spp. и

Acinetobacter spp. Ацетилтрансферазы AAC(3)-VII – AAC(3)-X выделены только у штаммов *Actinomyces* spp. [36].

Аминогликозид-аденилтрансферазы

Аминогликозиднуклеотидилтрансферазы (ANT), называемые также аминогликозидаденилтрансферазами (AAD), осуществляют модификацию молекулы аминогликозидных антибиотиков за счет аденилирования гидроксильных групп их молекул в присутствии АТФ в качестве ко-фактора.

Известно 4 типа нуклеотидилтрансфераз: ANT(4'), ANT(2''), ANT(3'')(9) и ANT(6').

Аденилтрансфераза ANT(4'), обозначаемая также как ANT(4')(4''), обуславливает резистентность стафилококков и стрептококков к амикацину, тобрамицину, канамицину, неомицину, мономицину, бутирозину, ливидомицину и исепамицину. Ген, кодирующий этот фермент, обнаружен как в составе низкомолекулярных многокопийных плазмид, так и среднемолекулярных низкокопийных плазмид.

Недавно обнаружена аденилтрансфераза ANT(4')-II, обуславливающая резистентность у семейства Enterobacteriaceae и *Pseudomonas* spp. к амикацину, канамицину, неомицину, исепамицину и тобрамицину [15, 34].

Аденилтрансфераза ANT(2'') широко распространена у бактерий семейства Enterobacteriaceae и *Pseudomonas* spp. [36]. Фермент модифицирует 2''-ОН группу гентамицина, тобрамицина и канамицина.

Для микроорганизмов, продуцирующих фермент ANT(3'')-I, характерна устойчивость к стрептомицину и спектиномицину. Имеются сообщения о продукции фермента ANT(3'')(9) штаммами *Pseudomonas* spp. [17]. Аденилтрансфераза ANT(9)-I, обнаруженная у штаммов *Staphylococcus* spp. и *Enterococcus* spp., приводит только к резистентности к спектиномицину [36].

Широкое распространение ферментативной устойчивости к аминогликозидам в клинике значительно обуславливается тенденцией структурных генов, опосредующих образование ферментов, локализоваться на плазмидах множественной лекарственной устойчивости и транспозонах [1, 11, 13]. Так, известно, что транспозоны Tn 903, Tn 1699 и Tn 602 несут гены, кодирующие образование APH(3'), транспозоны Tn 1696, Tn 800 и Tn 1700 – гены aac(3), Tn 2401 и Tn 2424 включают гены, кодирующие образование AAC(6'), и т. д.

При изучении структуры гена, кодирующего аденилтрансферазу ANT(3'')(9), показано, что он

входит в состав интегронов [17]. Определены нуклеотидные последовательности нескольких генов *aadB* и окружающих их генетических структур, в частности интегронов, выделенных из штаммов *E. coli*, *K. pneumoniae* и *S. oranienburg*. При этом отмечается высокая степень консервативности гена *aadB* и окружающих его последовательностей.

Имеются сообщения о локализации генов, опосредующих образование ферментов, на бактериальной хромосоме, что, вероятно, можно объяснить транслокацией этих генов в составе интегронов.

Очевидно, что преимущественная локализация генов аминогликозидрезистентности в составе плазмид и транспозонов способствует широкому распространению генов лекарственной устойчивости между различными микроорганизмами.

Методы выявления механизмов резистентности бактерий к аминогликозидам

В связи с широким распространением в клинической практике ферментативной устойчивости микроорганизмов к аминогликозидам большое значение приобретают методы, позволяющие быстро обнаружить и охарактеризовать активность ферментов. В настоящее время известны следующие методы определения активности АГМФ.

1. Метод радиохимического связывания определенного набора подвергнутых ферментативной модификации аминогликозидов с фосфоцеллюлозной бумагой [4]. В процессе ферментативной модификации в качестве ко-факторов используют АТФ, меченную радиоактивным фосфором или углеродом, или ацетил-коА, меченный углеродом [28]. По количеству включенной метки оценивают удельную активность фермента в отношении того или иного аминогликозида.

2. ДНК – ДНК гибридизация для выявления генов резистентности к аминогликозидам проводится с использованием лизированной чистой культуры, фиксированной на нитроцеллюлозных фильтрах [6, 7, 28]. Метод основан на использовании “зондов”, представляющих собой меченые денатурированные молекулы ДНК разного размера, гомологичные генам аминогликозидрезистентности. Метод используется в эпидемиологических исследованиях [4], а также при определении генов резистентности микроорганизмов непосредственно в клиническом образце [2].

3. Метод, основанный на соответствии фенотипа устойчивости бактерий к определенному набору аминогликозидов типам продуцируемых АГМФ.

Первый вариант этого метода основан на оценке значений минимальной подавляющей кон-

центрации (МПК) для 6 аминогликозидов (неомицин, канамицин, гентамицин, сизомицин, тобрамицин и амикацин). Он позволяет определить ферменты АРН(3'), ААС(3)-I или ААС(3)-II, АНТ(2''), а также их комбинации.

Вторая разновидность метода под названием метод АGRP (*aminoglycoside resistance patterns*) предполагает использование 12 аминогликозидов: канамицина, неомицина, гентамицина, тобрамицина, амикацина, нетилмицина, 2'-N-этилнетилмицина, 6'-N-этилнетилмицина, исепамицина, 5-эписизомицина, фортимицина и апрамицина [27]. В этом случае или определяют МПК аминогликозидов методом микроразведений в бульоне или агаре, не обогащенных катионами, или измеряют диаметры зон подавления роста при исследовании дискодиффузионным методом. Метод не позволяет определять ферменты, инактивирующие стрептомицин.

4. Определение АГМФ с помощью идентификации продуктов их инактивации методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) [4]. Метод позволяет идентифицировать фосфотрансферазы АРН(3'), АРН(2''), а также ацетилтрансферазы ААС(2'), ААС(3) и ААС(6') при одновременном присутствии их в неочищенных бесклеточных экстрактах. Идентификация осуществляется по предварительно рассчитанному (для известных инактивированных продуктов) времени удерживания исследуемого вещества на хроматографической колонке.

5. Анализ полиморфизма длины рестрикционных фрагментов плазмидной ДНК, кодирующей АГМФ [4]. Метод предусматривает расщепление плазмидной ДНК, выделенной из штаммов бактерий, с помощью рестрикционных эндонуклеаз и разделение продуктов рестрикции путем электрофореза в агарозном геле. Метод не позволяет точно идентифицировать АГМФ, но может использоваться в эпидемиологических исследованиях.

Наиболее распространенными методами типирования АГМФ являются методы ДНК – ДНК гибридизации и АGRP. Сравнивая эти методы, следует отметить, что каждый из них имеет определенные преимущества. ДНК – ДНК гибридизация является надежным методом определения наличия генов и позволяет выявить “молчащие” гены, которые невозможно определить методом АGRP, а также присутствие в штаммах нескольких генов с перекрывающимися спектрами антибиотикорезистентности.

Метод АGRP также является надежным методом определения типов АГМФ при условии, что штаммы не содержат генов с полностью перекрывающимися спектрами антибиотикорезистентности.

В отличие от ДНК – ДНК гибридизации метод АGRP позволяет выявлять штаммы, у которых резистентность к аминогликозидным антибиотикам обусловлена не только продукцией АГМФ, но и нарушением проницаемости клеточной стенки. Другим преимуществом метода АGRP является возможность выявления генов резистентности к аминогликозидным антибиотикам, имеющих высокую степень гомологии ДНК (то есть идентичных по результатам ДНК – ДНК гибридизации), но различающихся по спектру резистентности к аминогликозидам из-за наличия в них незначительных мутационных изменений.

При определении АГМФ этими двумя методами частота несовпадения результатов для основных клинически значимых ферментов составила меньше 3% [33].

Исходя из сказанного логично заключить, что для характеристики резистентности к аминогликозидам грамотрицательных микроорганизмов и стафилококков в клинической практике целесообразно использовать оба метода, АGRP и ДНК – ДНК гибридизации, позволяющие получать взаимодополняющие результаты [33].

Клиническое значение резистентности бактерий к аминогликозидам

В стационарах лечебно-профилактических учреждений России резистентность возбудителей нозокомиальных инфекций к аминогликозидам является большой терапевтической проблемой, более значимой, чем устойчивость к цефалоспорином третьего поколения, фторхинолонам или карбапенемам.

Так, устойчивость грамотрицательных бактерий к гентамицину (46 – 74%) значительно превосходит уровни, наблюдаемые в странах Европы (2,0 – 13,1%) [3, 31]. Вероятно, это связано с неоправданно широким использованием гентамицина не только в стационарах для лечения нозокомиальных инфекций, но и в амбулаторной практике для терапии внебольничных инфекций. Быстрому распространению устойчивости к аминогликозидам также способствует то, что гены, обуславливающие резистентность к аминогликозидам, локализуются на подвижных генетических элементах (транспозонах или плазидах) и могут передаваться от одного микроорганизма к другому.

В большинстве клиник обычно прогнозируют возможную эффективность аминогликозидов на основании рутинных данных по чувствительности к антибиотикам выделенных микроорганизмов. Однако такой подход может быть использован

только для отдельного больного при выборе конкретного антибиотика.

Предсказать возможную клиническую эффективность других аминогликозидов на основании тестирования микроорганизма к одному из них не представляется возможным, поскольку бактерии способны продуцировать различные АГМФ (в большинстве случаев их комбинации) [25], что обуславливает множество вариантов профилей устойчивости. Вопрос о замене неактивного аминогликозида на другой препарат этой же группы может быть решен либо на основании дополнительного тестирования, либо с учетом данных о преобладающих механизмах резистентности у возбудителей нозокомиальных инфекций в стационаре. Получены данные о том, что профиль АГМФ (основного механизма устойчивости к аминогликозидам) в стационарах различается в зависимости от преобладающей микрофлоры и от используемых аминогликозидов [12, 20, 26, 38].

Так, в исследовании, проведенном в США в 1974 – 1983 гг., когда наиболее часто используемым аминогликозидом был гентамицин, основным механизмом резистентности у грамотрицательных бактерий была продукция гентамицинмодифицирующих ферментов ANT(2'') – 81,4%, AAC(3)-V – 7% и AAC(3)-I – 3,6%. В 1980 – 1983 гг. в больницах Чили при преимущественном использовании гентамицина большинство штаммов грамотрицательных бактерий (96,6%) продуцировали фермент AAC(3)-V, модифицирующий гентамицин, тобрамицин и нетилмицин. Однако в тот же период (1980 – 1982 гг.) в Японии, где в основном использовали амикацин, дибекацин и канамицин, штаммы продуцировали следующие ферменты: ANT(2''), модифицирующий канамицин, дибекацин, гентамицин и тобрамицин (45,5%), AAC(6')-I, определяющий резистентность к канамицину, дибекацину, амикацину, нетилмицину и тобрамицину (12,8%), а также их комбинацию (37,6%).

При подобных исследованиях в России в 1993 – 1995 гг. установлено, что в одном из стационаров Москвы, где широко применяли гентамицин и амикацин, у грамотрицательных бактерий преобладали ферменты, обуславливающие резистентность к аминогликозидам второго поколения – ANT(2'') – 22,2% и AAC(3)-V – 33,3%, а также второго и третьего поколений – APH(3')-VI – 48,1%.

В то же время в другой больнице Москвы, а также в стационарах Смоленска и Краснодара, где основным применяемым аминогликозидом был гентамицин, получили распространение ферменты, модифицирующие гентамицин и тобрамицин, – ANT(2''), соответственно 46,3, 55,1 и 47,5%, или

Таблица 3. Распространенность аминогликозидмодифицирующих ферментов у клинических штаммов бактерий

Группа ферментов	Фермент	Основные субстраты (аминогликозиды)	Микроорганизм, наиболее часто продуцирующий фермент
Фосфотрансферазы	APH(3')-I	Канамицин, неомицин	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	APH(3')-II		
	APH(3')-VI	Канамицин, амикацин, исепамицин, неомицин	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>Acinetobacter</i> spp.
	APH(3')-III	Канамицин, неомицин, амикацин, исепамицин, стрептомицин	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>E. faecalis</i>
Ацетилтрансферазы	AAC(2')	Гентамицин, тобрамицин, нетилмицин, неомицин	<i>Providencia</i> spp., <i>Proteus</i> spp.
	AAC(6')-I	Тобрамицин, нетилмицин, канамицин, амикацин	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> spp.
	AAC(6')-II	Канамицин, гентамицин, тобрамицин, неомицин	<i>Pseudomonas</i> spp., <i>Serratia</i> spp.
	AAC(3)-I	Гентамицин	<i>Enterobacteriaceae</i>
	AAC(3)-II	Гентамицин, тобрамицин, нетилмицин, канамицин	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>Acinetobacter</i> spp.
	AAC(3)-III	Гентамицин, тобрамицин, канамицин	<i>P. aeruginosa</i>
Аденилилтрансферазы	ANT(4')-I	Тобрамицин, канамицин, неомицин, амикацин, исепамицин	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>E. faecalis</i>
	ANT(4')-II	Тобрамицин, канамицин, амикацин, исепамицин	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
	ANT(2'')-I	Гентамицин, тобрамицин, канамицин	<i>Enterobacteriaceae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Комбинированный фермент	AAC(6') + APH(2'')	Гентамицин, тобрамицин, неомицин, нетилмицин, амикацин, исепамицин	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>E. faecalis</i>

гентамицин, тобрамицин и нетилмицин при сохранении активности амикацина и исепамина – AAC(3)-V, соответственно 31,7, 34,8 и 33,9%. Причем во всех стационарах наблюдали одновременную продукцию двух или более ферментов, в том числе модифицирующих аминогликозиды первого поколения – APH(3')-I или APH(3')-II [3].

Распространенность одних и тех же ферментов у различных родов бактерий также широко варьирует (табл. 3). Например, ацетилтрансфераза AAC(3)-V, достаточно распространенный фермент у грамотрицательных бактерий, с разной частотой встречался у представителей семейства *Enterobacteriaceae* (60,3%), за исключением *Serratia* spp., у *Pseudomonas* spp. (18%), а также у *Acinetobacter* spp. (21,3%). Фосфотрансферазу APH(3')-VI преимущественно определяли у *Acinetobacter* spp. и представителей семейства *Enterobacteriaceae* – 35,4 и 29% соответственно и значительно реже у *Pseudomonas* spp. – 1,6% [36].

Учитывая особенности устойчивости грамотрицательных бактерий к аминогликозидным антибиотикам, в каждом стационаре необходимо иметь собственные данные о преобладающих механизмах ре-

зистентности для планирования рационального применения препаратов этой группы.

У стафилококков, как указывалось ранее, основным механизмом устойчивости к аминогликозидным антибиотикам является продукция бифункционального фермента AAC(6')+APH(2''), в результате чего эти микроорганизмы резистентны к неомицину, канамицину, гентамицину, тобрамицину, нетилмицину, амикацину и исепамицину, то есть к основным антибиотикам этого класса, используемым в клинической практике.

При исследовании резистентности клинических штаммов бактерий к аминогликозидам продукция этого фермента выявлена у 98,9% стафилококков, устойчивых к аминогликозидам, по сравнению с аденилилтрансферазой ANT(4')-I, которая обнаружена только у 30,2% штаммов [30]. Поэтому с практической точки зрения при выявлении штаммов стафилококков, устойчивых к гентамицину, их можно расценивать как резистентные ко всем используемым в России аминогликозидам.

Следует подчеркнуть, что резистентные к аминогликозидам штаммы наиболее распространены среди метициллинорезистентных стафилококков. Так, результаты многоцентрового исследования

показали, что метициллинорезистентные золотистые стафилококки в 79,4% случаев были устойчивы к гентамицину, а метициллиночувствительные штаммы – только в 6,9%. Метициллинорезистентные коагулазонегативные стафилококки были устойчивы к гентамицину в 62,4% случаев, а метициллиночувствительные штаммы – в 13% [30].

На основании полученных данных не следует рекомендовать использование таких аминогликозидов, как канамицин, стрептомицин, гентамицин, тобрамицин, нетилмицин, амикацин и исепамицин, для лечения больных с инфекциями, вызванными метициллинорезистентными стафилококками.

Известно, что все энтерококки имеют низкий уровень резистентности к аминогликозидам за счет их плохого проникновения внутрь бактериальной клетки. Совместное использование аминогликозидов с бета-лактамами или гликопептидными антибиотиками повышает клеточную проницаемость для аминогликозидов. Этот эффект обусловлен тем, что бета-лактамы и гликопептидные антибиотики нарушают синтез пептидогликана, в результате чего облегчается проникновение аминогликозидов внутрь бактериальной клетки, то есть наблюдается синергизм в действии этих групп антибактериальных препаратов [43]. Наибольшую проблему в клинике составляют энтерококки с высоким уровнем устойчивости к аминогликозидам, в первую

очередь к гентамицину и стрептомицину. У этих штаммов резистентность обусловлена продукцией АГМФ [43], причем к стрептомицину устойчивость, как правило, формируется за счет продукции плазмидной фосфотрансферазы APH(3')-III и аденилилтрансферазы ANT(6')-I.

Бифункциональный фермент APH(2'') + AAC(6') приводит к устойчивости к гентамицину и к другим аминогликозидам второго и третьего поколений при сохранении чувствительности к стрептомицину. При одновременной продукции микроорганизмами двух и более ферментов наблюдается устойчивость ко всем аминогликозидным антибиотикам. Учитывая особенности резистентности энтерококков к аминогликозидам, необходимо выявлять штаммы с высоким уровнем устойчивости к аминогликозидам как к гентамицину, так и к стрептомицину.

Приведенные данные свидетельствуют о том, что микробиологам и клиницистам необходимо хорошо представлять особенности резистентности к аминогликозидам у клинически значимых микроорганизмов. Для проведения эффективной антибактериальной терапии важно иметь данные о преобладающих механизмах устойчивости как в регионе, так и в отдельном стационаре. При отсутствии корректных эпидемиологических данных эмпирическая терапия аминогликозидными антибиотиками может представлять большие трудности.

Литература

1. Вакуленко С.Б. Бактериальные ферменты, инактивирующие аминогликозидные антибиотики и кодирующие их гены // Антибиотики. – 1992. – № 4. – С. 49 – 54.
2. Вакуленко С.Б. Методы гибридизации нуклеиновых кислот: использование для детекции и изучения распространения генов лекарственной устойчивости // Антибиотики. – 1992. – № 3. – С. 44 – 50.
3. Решедько Г.К. Фармакодинамическое обоснование повышения эффективности аминогликозидов при лечении грам(-) госпитальных инфекций: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. – Смоленск, 1997. – 22 с.
4. Таисова А.С. Ферменты, инактивирующие аминогликозиды: современное состояние проблемы // Антибиотики. – 1990. – № 6. – С. 51 – 55.
5. Bryan L. E. General mechanisms of resistance to antibiotics // J. Antimicrob. Chemother. – 1988. – Vol. 22. – P. 1 – 15.
6. Clarke A.J., Francis D., Keenleyside W.J. The prevalence of gentamicin 2'-N-acetyltransferase in the Proteaceae and its role in the O-acetylation of peptidoglycan // FEMS Microbiol Lett. – 1996. – Vol. 145. – P. 201 – 207.
7. Coleman K. et al. Bacterial resistance mechanisms as therapeutic targets // J. Antimicrob. Chemother. – 1994. – Vol. 33. – P. 1091 – 1116.
8. Comez-Lus R., Rivera M., Bobey D. Chromosomal origin of acetyltransferase AAC(6') specifying amikacin resistance in *Serratia marcescens* // Microbiologia Sem. – 1987. – Vol. 3. – P. 185 – 194.
9. Elisha B.G., Steyn L.M. High level kanamycin resistance associated with the hyperproduction of AAC(3)-II and a generalised reduction in the accumulation of aminoglycosides in *Acinetobacter* spp. // J. Antimicrob. Chemother. – 1994. – Vol. 34. – P. 457 – 464.
10. Garcia-Agata M.I., Alarcon T., Lopez-Brea M. Emergence of resistant isolates of *Acinetobacter calcoaceticus* – *A. baumannii* complex in a Spanish hospital over a five-year period // Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. – 1996. – Vol. 15. – P. 512 – 515.
11. Gaynes R., Groisman E., Lerner S. Isolation, characterization and cloning of a plasmid-borne gene encoding a phosphotransferase that confers high-level amikacin resistance in enteric bacilli // Antimicrob. Agents Chemother. – 1988. – Vol. 32. – P. 1379 – 1384.
12. Glupczynski Y., MacGillavry G., Yourassowsky E. Epidemiology of aminoglycoside resistance in hospitals using netilmicin as sole aminoglycoside: a long-term surveillance study // Scientific Symposium. – Sorrento, Italy. – 1987. – P. 51 – 54.

13. Gould I.M. Risk factors for acquisition of multiply drug-resistant gram-negative bacteria // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 1994. – Vol. 13 – suppl. 1. – P. 30 – 38.
14. Harrell L. R., Evans L. B. Anaerobic resistance of clinical isolates of *Staphylococcus aureus* to aminoglycosides // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1978. – Vol. 14. – P. 927 – 929.
15. Jacoby G.A., Blaser M.J., Santanam P. Appearance of amikacin and tobramycin resistance due to 4'-aminoglycoside nucleotidyltransferase [ANT(4')-II] in Gram-negative pathogens // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1990. – Vol. 34. – P. 2381 – 2386.
16. Johnson A.P. et al. Gentamicin resistance in clinical isolates of *Escherichia coli* encoded by genes of veterinary origin // *J. Med. Microbiol.* – 1994. – Vol. 40. – P. 221 – 226.
17. Kazama H., Kizu K., Iwasaki M. A new gene, aadA2b, encoding an aminoglycoside adenyltransferase, AAD(3'')(9), isolated from integron InC in *Pseudomonas aeruginosa* // *Microbios.* – 1996. – Vol. 86. – P. 77 – 83.
18. Lambert T., Gerbaud G. Structural relationship between the genes encoding 3'-aminoglycoside phosphotransferases in *Campylobacter* and in gram-positive cocci. // *Ann. Inst. Pasteur / Microbiol.* – 1985. – Vol. 136B. – P. 135 – 150.
19. Lambert T., Gerbaud G., Galimand M., Courvalin P. Characterization of *Acinetobacter haemolyticus* aac(6')-I_g gene encoding an aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase which modifies amikacin // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1993. – Vol. 37. – P. 2093 – 2100.
20. Landuyt H. W. V., Boelaert J., Glibert B., Gordts B. Surveillance of aminoglycoside resistance // *Amer. J. Med.* – 1986. – Vol. 80, suppl. 6B. – P. 76 – 81.
21. LeBlanc D.J., Lee L.N., Inamine J.M. Cloning and nucleotide sequence analysis of a spectinomycin adenyltransferase AAD(9) determinant from *Enterococcus faecalis* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1991. – Vol. 35. – P. 1804 – 1810.
22. Lovering A. M., White L. O., Reeves D.S. AAC(1): a new aminoglycoside-acetylating enzyme modifying the C1 aminogroup of apramycin // *J. Antimicrob. Chemother.* – 1987. – Vol. 20. – P. 803 – 813.
23. Lovering A.M., Bywater M.J., Holt H.A. et al. Resistance of bacterial pathogens to four aminoglycosides and six other antibacterials and prevalence of aminoglycoside modifying enzymes, in 20 UK centres // *J. Antimicrob. Chemother.* – 1988. – Vol. 22. – P. 823 – 839.
24. Meyer J.R., Nies B.A., Wiedemann B. Amikacin resistance mediated by multiresistance transposon Tn 2424. // *J. Bacteriol.* – 1983. – Vol. 155. – P. 755 – 760.
25. Miller G.H. and aminoglycoside resistance study groups. Increasing complexity of aminoglycoside resistance mechanisms in gram-negative bacteria // *APUA Newsletter.* – 1994. – Vol. 12.
26. Miller G.H., Sabatelli F. J., Hare R.S. et al. The most frequent aminoglycoside resistance mechanisms – changes with time and geographic area: a reflection of aminoglycoside usage patterns? // *Clin. Infect. Dis.* – 1997. – Vol. 24, suppl. 1. – P. S46 – S62.
27. Miller G. H., Sabatelli F. J., Naples L. The utilization of aminoglycoside resistance phenotypes for the determination of aminoglycoside resistance mechanisms. Schering-Plough research institute, 1995. – 43 p.
28. Rather P.N., Mierzwa R., Hare R.S. et al. Cloning and DNA sequence analysis of an aac(3)-Vb gene from *Serratia marcescens* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1992. – Vol. 36. – P. 2222 – 2227.
29. Rather P.N., Miller G.H., Shaw K.J. Genetic analysis of bacterial acetyltransferases: identification of amino acids determining the specificities of the aminoglycoside 6'-N-acetyltransferase Ib and Iia proteins // *J. Bacteriol.* – 1992. – Vol. 174. – P. 3196 – 3203.
30. Schmitz F. J., Fluit A.C., Gondolf M. et al. The prevalence of aminoglycoside resistance and corresponding resistance genes in clinical isolates of staphylococci from 19 European hospitals // *J. Antimicrob. Chemother.* – 1999. – Vol. 43. – P. 253 – 259.
31. Schmitz F.-J., Verhoef L., Fluit A.C., and the SENTRY Participants Group. Prevalence of aminoglycoside resistance in 20 European university hospitals participating in the European SENTRY Antimicrobial surveillance programme // *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* – 1999. – Vol. 18. – P. 414 – 421.
32. Shaw K.J., Cramer C.A., Rizzo M. et al. Isolation, characterization, and DNA sequence analysis of an AAC(6')-II gene from *Pseudomonas aeruginosa* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1989. – Vol. 33. – P. 2052 – 2062.
33. Shaw K.J., Hare R.S., Sabatelli F.J. et al. Correlation between aminoglycoside resistance profiles and DNA hybridization of clinical isolates // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1991. – Vol. 35. – P. 2253 – 2261.
34. Shaw K.J., Munayyer H., Miller G.H. Nucleotide sequence analysis and DNA hybridization studies of the ant(4')-IIa gene from *Pseudomonas aeruginosa* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1993. – Vol. 37. – P. 708 – 714.
35. Shaw K.J., Rather P.N., Sabatelli F.J., Mann P. et al. Characterization of the chromosomal aac(6')-Ic gene from *Serratia marcescens* // *Antimicrob. Agents Chemother.* – 1992. – Vol. 36. – P. 1447 – 1455.
36. Shaw K.J., Rather P.N., Hare R.S. Miller G.H. Molecular genetics of aminoglycoside resistance genes and familial relationships of the aminoglycoside-modifying enzymes // *Microbiol. Rev.* – 1993. – Vol. 57. – P. 138 – 163.
37. Tait S., Amyes S.G.B. Two different inserts are present in the recombination locus of Tn 21 – like transposons from *Acinetobacter* spp. // 36th ICAAC Conference. – 1996. – Abstr. C 51.
38. The Belgian Ag R study group and Glupczynski Y., Miller G., Sabatelli F. et al. Changes in Aminoglycoside (Ag) Resistance (R) Mechanisms (M) in Belgium over 15 years // 36-th ICAAC Conference. – 1996. – Abstr. C 124.
39. The French Ag R M group and Bismuth R., Collatz E., Lambert T. et al. Aminoglycoside (Ag) Resistance (R) Mechanisms (M) in France from '89 to '93 // 36-th ICAAC Conference. – 1996. – Abstr. C 125.
40. Vliegthart J.S., Ketelaar-van Gaalen P.A.G., Van de Klundert J.A.M. Nucleotide sequence of the aacC3 gene, a

- gentamicin resistance determinant encoding aminoglycoside-(3)-N-acetyltransferase III expressed in *Pseudomonas aeruginosa* but not in *Escherichia coli*. // *Antimicrob Agents Chemother.* – 1991. – Vol. 35. – P. 892 – 897.
41. Wohlleben W., Arnold W., Bissonnette L. et al. On the evolution of the Tn 21-like multiresistance transposons: sequence analysis of the gene (aacCI) for gentamicin acetyltransferase-3-I(AAC(3)-I), another member of the Tn 21 – based expression cassette // *Mol. Gen. Genet.* – 1989. – Vol. 217. – P. 202 – 208.
42. Wu H.Y., Shaw K.J., Hare R.S., Miller G. Aminoglycoside resistance gene from *Citrobacter freundii* // 36-th ICAAC Conference. – 1996. – Abstr. C 099.
43. Zigelboim-Daum S., Moellering R.C.Jr. Mechanisms and significance of antimicrobial resistance in enterococci // Paul Actor et al. eds. *Antibiotic inhibition of bacterial cell.* – 1988. – P. 603 – 615.