

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

«УТВЕРЖДАЮ»

Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

2015 г.

Регистрационный № 001-0115



**МЕТОД ВЫБОРА АНТИБАКТЕРИАЛЬНЫХ ЛЕКАРСТВЕННЫХ  
СРЕДСТВ ПРИ БАКТЕРИАЛЬНЫХ ИНФЕКЦИЯХ В АКУШЕРСТВЕ  
И ГИНЕКОЛОГИИ**

*Инструкция по применению*

**Учреждение - разработчик:**

Учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы  
народов медицинский университет»

**Авторы:** д.м.н., доцент Семенов Д.М., д.м.н. профессор Семенов В.М.,  
Занько А.С., Сушкова О.С.

**Витебск, 2015**

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод исследования уровня и количественной оценки бета-лактамазной активности биологических субстратов (сыворотки крови и околоплодных вод), позволяющий осуществить рациональный подбор антибактериальной терапии в акушерстве и гинекологии и избежать неэффективного применения бета-лактаменных антибиотиков.

Инструкция предназначена для врачей-акушеров-гинекологов, врачей клинической лабораторной диагностики, иных врачей-специалистов, оказывающих медицинскую помощь беременным женщинам с бактериальными инфекциями.

#### ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ, ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ

1. Фотометр планшетного типа с набором фильтров 300 – 600 нм.
2. Тест система БИОЛАКТАМ (ТУ ВУ 391353648.001–2011).
3. Одноразовый шприц медицинский с иглой (объем 2 мл.).
4. Пробирки пластиковые типа Эппендорф.
5. Стерильные перчатки.
6. Холодильная установка.
7. Термостат (25°C).
8. Центрифуга.
9. Дозаторы пипеточные переменного объема 10-100 и 100–1000 мкл.

#### ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Проведение антибактериальной терапии в акушерстве и гинекологии при бактериальных инфекциях, внутриутробном инфицировании плода.

#### ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

#### ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод основан на определении изменения окраски синтетического антибиотика цефалоспоринового ряда при распаде его бета-лактамной связи. При этом происходит батохромный сдвиг в хромофорной системе молекулы, и окраска реакционной смеси меняется с желтой на красно-оранжевую. Максимум поглощения продукта реакции меняется с 390 нм на 486 нм, что и делает возможным спектрофотометрическую детекцию. Бета-лактамазная активность оценивается в % распада стандартного количества используемого цефалоспорины, вносимого в пробу.

Определение бета-лактамазной активности околоплодных вод  
Проведение забора исследуемого материала: Забор венозной крови

осуществляется общепринятыми методами. Сыворотку крови, получают путем центрифугирования цельной свежеполученной венозной крови, выдержанной в холодильной камере при +4°C в течение 4-6 часов для образования фибринного сгустка, при 3000 об/мин в течение 15 минут. Забор околоплодных вод производят во время оперативного родоразрешения в стерильную пробирку.

Определение бета-лактамазной активности сыворотки крови

Приготовление рабочих растворов:

Приготовление буферного раствора – во Флакон 2 добавляют 4,6 мл воды дистиллированной, интенсивно перемешивают до полного растворения.

Приготовление маточного раствора субстрата-хромогена - во Флакон 1 помещают 500,0 мкл буферного раствора, осторожно перемешивают до растворения субстрата-хромогена. Маточный раствор допускается хранить в морозильной камере при -18°C в течение 1 месяца.

Приготовление рабочего раствора субстрата-хромогена (далее «Хромоген») – к приготовленному маточному раствору субстрата-хромогена добавляют 4,0 мл буферного раствора. Раствор не хранить и использовать в день приготовления (один флакон на 20 определений и 4 контроля).

Приготовление катализирующего раствора (далее «Пенициллиназа») – во Флакон 3 вносят 100 мкл воды дистиллированной и осторожно перемешивают до полного растворения фермента.

Ход определения:

Для оптимального расположения опытных и контрольных образцов на планшете рекомендуется использовать подложку с цветовой индикацией, прилагаемую к тест-системе.

Для приготовления опытных образцов в лунки иммунологического планшета вносят 20 мкл сыворотки крови и прибавляют 180 мкл Хромогена.

Для приготовления контрольных образцов мутности в лунки иммунологического планшета вносят 20 мкл сыворотки крови и прибавляют 180 мкл воды дистиллированной.

Для приготовления образцов Полного Распада (ПР) в лунки иммунологического планшета вносят 20 мкл Пенициллиназы и прибавляют 180 мкл Хромогена.

Для приготовления Реагентного Бланка (РБ) в лунки иммунологического планшета вносят 20 мкл воды дистиллированной и прибавляют 180 мкл Хромогена.

Все приготовленные образцы инкубируют в термостате (37°C) в течение 30 минут.

Измеряют оптическую плотность на планшетном ридере (светофильтр 492 (505) нм) против воздуха.

Наименование образца	Сыворотка крови (мкл)	Пенициллиназа (мкл)	Вода дистиллированная (мкл)	Хромоген (мкл)
Испытуемый образец (О)	20	-	-	180
Контроль (К)	20	-	180	-
Реагентный бланк (РБ)	-	-	20	180
Полный распад (ПР)	-	20	-	180

Определение бета-лактамазной активности околоплодных вод

Приготовление рабочих растворов:

Приготовление буферного раствора – во Флакон 2 добавляют 4,6 мл воды дистиллированной, интенсивно перемешивают до полного растворения.

Приготовление маточного раствора субстрата-хромогена - во Флакон 1 помещают 500,0 мкл буферного раствора, осторожно перемешивают до растворения субстрата-хромогена. Маточный раствор допускается хранить в морозильной камере при  $-18^{\circ}\text{C}$  в течение 1 месяца.

Приготовление рабочего раствора субстрата-хромогена (далее «Хромоген») – к приготовленному маточному раствору субстрата-хромогена прибавляют 2,0 мл буферного раствора. Раствор не хранить и использовать в день приготовления (один флакон на 20 определений и 4 контроля).

Приготовление катализирующего раствора (далее «Пенициллиназа») – во Флакон 3 вносят 100 мкл воды дистиллированной и осторожно перемешивают до полного растворения фермента.

Ход определения:

Для оптимального расположения опытных и контрольных образцов на планшете рекомендуется использовать подложку, прилагаемую к тест-системе.

В лунки иммунологического планшета вносят 100 мкл испытуемого биологического субстрата (околоплодные воды) и прибавляют 100 мкл Хромогена.

Для приготовления контрольных образцов мутности в лунки иммунологического планшета вносят 100 мкл биологического субстрата и прибавляют 100 мкл воды дистиллированной.

Для приготовления образцов полного распада в лунки иммунологического планшета вносят 20 мкл Пенициллиназы, 80 мкл воды дистиллированной и прибавляют 100 мкл Хромогена.

Для приготовления реагентного бланка в лунки иммунологического

планшета вносят 100 мкл воды дистиллированной и прибавляют 100 мкл Хромогена.

Наименование образца	Биосубстрат (мкл)	Пенициллиназа (мкл)	Вода дистиллированная (мкл)	Хромоген (мкл)
Испытуемый образец (О)	100	-	-	100
Контроль (К)	100	-	100	-
Реагентный бланк (РБ)	-	-	100	100
Полный распад (ПР)	-	20	80	100

Все приготовленные образцы инкубируют в термостате (37°C) в течение 120 минут.

Измеряют оптическую плотность на планшетном ридере (светофильтр 492 (505) нм.) против воздуха.

#### Учет результатов

Для каждого образца рассчитать активность по формуле:

$$A = \frac{(O - K) - (PB - ПЯ)}{ПР - ПЯ} \times 100$$

где:

А – искомая бета-лактамазная активность опытных образцов;

О – оптическая плотность опытных образцов;

К – оптическая плотность контрольных образцов;

РБ – оптическая плотность Реагентного Бланка;

ПР – среднее значение оптических плотностей Полного Распада;

ПЯ – среднее значение оптических плотностей пустых ячеек.

#### Учитываемые критерии:

Для сыворотки крови – при А более 68,2% полного распада субстрата-хромогена рекомендуется коррекция проводимой пациентке антибактериальной терапии (назначение ингибитор-защищенных бета-лактамов либо антибиотиков из других фармакологических групп со сходным спектром активности).

Для околоплодных вод - А более 40,0% полного распада субстрата-хромогена указывает на необходимость вышеописанной коррекции антибактериальной терапии.

#### ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

Отсутствуют.