

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ  
Первый заместитель Министра  
Д.Л. Пиневич  
2015 г.  
Регистрационный № 113-1015



**МЕТОД РАЦИОНАЛЬНОГО НАЗНАЧЕНИЯ АНТИБАКТЕРИАЛЬНОЙ  
ТЕРАПИИ ПРИ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ЗАБОЛЕВАНИЯХ  
ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ**

инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:**

УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

**АВТОРЫ:**

д.м.н., доцент И.В. Жильцов; д.м.н., профессор В.М. Семенов; Т.А. Торосян,  
С.К. Егоров, С.И. Хайрулина

Витебск, 2015

В настоящей инструкции по применению представлен метод оптимизации антибактериальной терапии, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на лечение пациентов с гнойно-воспалительными заболеваниями (ГВЗ) челюстно-лицевой области (ЧЛО).

Метод основан на количественной оценке собственной бета-лактамазной активности ротовой жидкости пациентов с ГВЗ ЧЛО с последующим назначением определённых антибактериальных препаратов в зависимости от выявленного уровня активности. Метод позволяет обнаружить и учесть устойчивость к антибиотикам бета-лактамного ряда, опосредуемую т.н. ко-патогенной микрофлорой ротовой полости, не выявляемой при рутинном бактериологическом анализе. Оптимизация антибактериальной терапии, достигаемая при использовании метода, изложенного в настоящей инструкции по применению, позволяет сократить продолжительность госпитализации пациентов с ГВЗ ЧЛО, а также снизить сопутствующие расходы (оплата листов временной нетрудоспособности, падение ВВП вследствие отсутствия работников на рабочих местах).

Метод оптимизации антибактериальной терапии, назначаемой пациентам с ГВЗ ЧЛО, при помощи количественной оценки бета-лактамазной активности их ротовой жидкости, может быть использован в комплексе оказания медицинских услуг, направленных на повышение эффективности назначаемой таким пациентам стартовой эмпирической этиотропной терапии, снижение общей стоимости оказываемой им специализированной медицинской помощи и, в частности, на сокращение продолжительности их пребывания в стационаре.

#### **Перечень необходимых медицинских изделий, реактивов, лекарственных средств и др.**

1. Фотометр планшетного типа с набором фильтров 300-600 нм.
2. Одноразовый шприц медицинский с иглой (объём 2 мл).
3. Пробирки пластиковые типа Эппендорф.
4. Стерильные перчатки.
5. Холодильная установка.
6. Термостат (37°C).
7. Центрифуга.
8. Дозаторы пипеточные переменного объёма 10-100 и 100-1000 мкл.
9. Дистиллированная вода.
10. Фосфатный буферный раствор (0,1 М с рН 7,4).
11. Субстанция нитроцефина (CAS 41906-86-9).
12. Пенициллиназа лиофилизированная (ФС 42-2059-83).
13. Планшеты иммунологические 96-луночные.

Вместо пунктов 10-13 допускается применение тест-систем любого производителя, зарегистрированных Министерством здравоохранения Республики Беларусь и предназначенных для количественного определения бета-лактамазной активности биологических субстратов путём учёта распада нитроцефина.

### Показания к применению

Проведение антибактериальной терапии пациентам с ГВЗ ЧЛО (гнойными тонзиллитами, абсцессами либо флегмонами мягких тканей челюстно-лицевой области и т.п.). Метод может применяться как для назначения стартовой эмпирической антибактериальной терапии при первичном поступлении пациента в стационар, так и для коррекции уже проводимой терапии.

### Противопоказания к применению

Отсутствуют.

### Описание технологии использования метода

Метод основан на определении изменения окраски синтетического антибиотика цефалоспоринового ряда нитроцефина 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 нитроцефина, вносимого в пробу, содержащую испытуемый образец.

Образцы ротовой жидкости пациентов лучше использовать в день отбора, но возможно их хранение при  $-20^{\circ}\text{C}$  в пробирках Эппендорфа в течение 1 месяца. Непосредственно перед проведением исследования все пробы необходимо одновременно разморозить (если они замораживались), после чего их центрифугируют при 10000 об/мин в течение 5 минут. По окончании центрифугирования отделяют прозрачный надосадок ротовой жидкости, который и используют для измерения уровня бета-лактамазной активности.

Для приготовления опытных образцов (О) в лунки иммунологического планшета вносят 100 мкл испытуемого образца ротовой жидкости и прибавляют 100 мкл раствора нитроцефина (0,05 мг/мл) в 0,1 М ФБР, pH 7,4.

Для приготовления контрольных образцов мутности (К) в лунки иммунологического планшета вносят 100 мкл испытуемого образца ротовой жидкости и прибавляют 100 мкл воды дистиллированной.

Для приготовления реagentного бланка (РБ) в лунки иммунологического планшета вносят 100 мкл воды дистиллированной и прибавляют 100 мкл раствора нитроцефина (0,05 мг/мл) в 0,1 М ФБР, pH 7,4.

Для приготовления образцов полного распада (ПР) в лунки иммунологического планшета вносят 20 мкл раствора пенициллиназы (10000 МЕ фермента в 100 мкл воды дистиллированной) и прибавляют 80 мкл воды дистиллированной и 100 мкл раствора нитроцефина (0,05 мг/мл) в 0,1 М ФБР, pH 7,4.

Наименование образца	Ротовая жид-кость (мкл)	Раствор пени-циллиназы (мкл)	Вода дистилли-рованная (мкл)	Раствор нитро-цефина (мкл)
Испытуемый образец (О)	100	—	—	100
Контроль (К)	100	—	100	—

Реагентный бланк (РБ)	–	–	100	100
Полный распад (ПР)	–	20	80	100

Опытные образцы и контрольные пробы инкубируют при 37°C в течение 120 минут. После инкубации производят замер оптической плотности при  $\lambda=492$  нм. Расчет количества нитроцефина (в % от исходно внесенного в ячейку), распавшегося за время инкубации, производился по формуле:

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

где:

А – уровень бета-лактамазной активности испытуемого образца ротовой жидкости (%);

О – оптическая плотность опытной пробы с добавлением испытуемого образца ротовой жидкости;

К – оптическая плотность контроля мутности;

РБ – оптическая плотность реагентного бланка;

ПЯ – средняя оптическая плотность пустых ячеек планшета;

ПР – оптическая плотность контроля полного распада нитроцефина.

#### Учитываемые критерии

Интервал значений бета-лактамазной активности ротовой жидкости от 40 до 70% следует считать соответствующим возможному наличию устойчивости к бета-лактамам антибиотикам первой линии (пенициллинам и цефалоспорином 1 и 2 поколения, незащищенным аминопенициллинам, цефалоспорином 3 поколения), а  $\geq 70\%$  – вероятному наличию устойчивости к данным антибактериальным препаратам. Общий риск неудачи стартовой эмпирической этиотропной терапии у пациентов с бета-лактамазной активностью ротовой жидкости  $\geq 40\%$  в 3-12 раз, а у пациентов с активностью  $\geq 70\%$  – в 4-14 раз выше, чем у пациентов с бета-лактамазной активностью ротовой жидкости  $< 40\%$ .

Соответственно, при уровне бета-лактамазной активности ротовой жидкости пациентов с ГВЗ ЧЛЮ в пределах 40-70% следует рекомендовать назначение ингибитор-защищенных бета-лактамов и/или антибиотиков из других фармакологических групп с аналогичным спектром действия (цефалоспоринов 4 поколения, карбапенемов, фторхинолонов, аминогликозидов и др.), а при уровне активности ротовой жидкости  $\geq 70\%$  необходимо обязательно назначать указанные антибактериальные препараты.

#### **Перечень возможных осложнений или ошибок при выполнении и пути их устранения**

1. Значительная примесь человеческого сывороточного альбумина (ЧСА) в анализируемом образце. ЧСА обладает собственной бета-лактамазной активностью, но она существенно ниже, чем у бактериальных бета-лактамаз. Тем не менее, ЧСА в концентрации, превышающей 3-5 мг/мл, может вносить сущест-

венную погрешность в результаты измерений, увеличивая регистрируемый уровень бета-лактамазной активности. Наблюдается обычно в случае попадания большого количества крови в ротовую жидкость.

Возможные пути устранения:

- не анализировать образцы ротовой жидкости, содержащие видимую примесь крови;

- отбирать образцы ротовой жидкости для анализа до оперативного вмешательства на органах челюстно-лицевой области (если таковое вмешательство показано пациенту);

- встряхивать «проблемные» образцы ротовой жидкости со взвесью гранул голубой сефарозы (Sigma-Aldrich, CAS 66456-82-4) в течение 30 минут. Один миллилитр взвеси селективно связывает  $\geq 11$  мг ЧСА; для обработки одной пробы ротовой жидкости достаточно 0,1 мл взвеси, которая затем легко удаляется центрифугированием при 5000 об/мин в течение 1 минуты.

2. Повышенная мутность анализируемого образца из-за неполного удаления плотной части ротовой жидкости при центрифугировании приводит к существенному снижению чувствительности методики.

Возможные пути устранения:

- повторно центрифугировать «проблемный» образец ротовой жидкости в течение 5 минут, увеличив при необходимости скорость вращения центрифуги вплоть до 14500 об/мин. Надосадочную жидкость следует отбирать аккуратно, стараясь не потревожить слой осадка наконечником пипетки; если это произошло – нужно снова подвергнуть образец центрифугированию.

3. Ошибки при дозировании реагентов и/или анализируемых образцов ротовой жидкости в ходе приготовления опытных и контрольных проб, что приводит к неодинаковому объёму проб и существенному снижению точности определения бета-лактамазной активности (пробы различного объёма можно заметить при внешнем осмотре иммунологического планшета).

Возможные пути устранения:

- аккуратно и тщательно отмерять требуемые объёмы химических реагентов и анализируемых образцов ротовой жидкости (желательно использовать для этого методику *обратного дозирования*).

4. На поверхности жидкости в лунке иммунологического планшета имеется пузырьёк воздуха, что увеличивает результаты замеров оптической плотности образца в данной лунке на 20-40%.

Возможные пути устранения:

- смешивать компоненты проб аккуратно и медленно, избегая образования пузырьков на поверхности жидкости;

- при образовании пузырьков – аккуратно удалить их пипеткой с рабочим объёмом 2...20 мкл, предварительно надев на неё чистый наконечник.

5. При приготовлении опытных проб использован раствор нитроцефина с истёкшим сроком годности, что приводит к уменьшению определяемого уровня бета-лактамазной активности по сравнению с его истинным значением.

Возможные пути устранения:

- никогда не использовать реагенты с истёкшим сроком годности.

6. Микроскопические капли раствора пенициллиназы, используемого для приготовления контролей полного распада нитроцефина, попали в лунки иммунологического планшета с анализируемыми образцами. В результате в некоторых пробах случайным образом выявляется необычно высокий уровень бета-лактамазной активности (если несколько проб приготовлено из одного и того же образца ротовой жидкости, то активность в контаминированной пробе будет значительно выше, чем в остальных).

Возможные пути устранения:

- определять бета-лактамазную активность одного образца ротовой жидкости минимум дважды (т.е. дублировать пробы), чтобы можно было выявить необычно высокую внутри-экспериментальную вариабельность измеренного уровня активности. Одновременно возрастает точность измерений;

- вносить раствор пенициллиназы в лунки иммунологического планшета предельно аккуратно, касаясь наконечником пипетки дна соответствующих лунок, лучше – перед внесением всех прочих реактивов и образцов, прикрывая пустые ячейки планшета его крышкой и немедленно удаляя отработанные наконечники из рабочей зоны. Желательно также вскрывать флаконы с лиофилизированной пенициллиназой и готовить её рабочий раствор в стороне от основной рабочей зоны (например, на другом столе).