

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть
11 июня 2009 г.
Регистрационный № 035-0409

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ В-ЛАКТАМАЗНОЙ АКТИВНОСТИ
СЫВОРТКИ КРОВИ БОЛЬНЫХ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Витебский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. В.М. Семенов, канд. мед. наук, доц.
И.В. Жильцов, ст. науч. сотр. И.С. Веремей, С.К. Зенькова

Витебск 2009

Антибиотикоустойчивость бактерий на текущий момент является одной из наиболее важных и актуальных проблем инфектологии. Практически все известные науке бактерии — возбудители инфекционных заболеваний (за редким исключением) в большей или меньшей степени проявляют устойчивость к тем или иным антибактериальным препаратам.

Известно, что за разрушение β -лактамных антибиотиков отвечают бактериальные ферменты из группы β -лактамаз, причем в человеческом организме аналоги данного фермента отсутствуют (Avalle B., 2007). Тем не менее, имеются публикации, утверждающие, что гемолизирующая кровь может разрушать 3-ацетоксиметил-цефалоспорины (цефалотин, цефотаксим) (Wright W., 1980). Более того, известно, что карбапенемы (в частности, имипенем) разрушаются почечными дегидропептидазами, причем продукты распада нейротоксичны для некоторых млекопитающих; именно поэтому в состав коммерческого препарата имипенема был введен ингибитор почечных дегидропептидаз циластатин (Moellering R., 1989). Данные наблюдения показывают, что антибиотики β -лактамного ряда в принципе могут разрушаться кроме β -лактамаз какими-либо компонентами цельной крови, и возможно плазмы или сыворотки (например, гемоглобином либо ферментами системы фибринолиза) (Жильцов И.В., 2006). Устойчивость к антибиотикам, связанную с их разрушением макроорганизмом, мы называем «биологической» в отличие от классической «микробиологической» устойчивости, связанной со специфическими особенностями бактериальных клеток. Таким образом, обнаружение в крови факторов (возможно, нескольких), усиленно разрушающих β -лактамные антибиотики, может прямо указывать на одну из причин низкой эффективности указанных средств. Возможно, именно инактивация антибиотиков макроорганизмом лежит в основе появления антибиотикорезистентности *in vivo* при ее отсутствии или незначительной выраженности *in vitro*. Очевидно, что у больных с высокой пенициллиназной активностью крови обычные препараты β -лактамного ряда (пенициллины, цефалоспорины) окажутся неэффективными или малоэффективными. У таких пациентов наиболее оправданным было бы применение ингибитор-защищенных пенициллинов (амоксиклава, уназина, тиментина и др.) либо препаратов других фармакологических групп. Тем не менее, для принятия данного решения необходимо достоверно установить наличие в крови больного β -лактамазной активности, а также, по возможности, оценить ее уровень. Своевременная смена антибактериальной терапии имеет особое значение при тяжелом течении бактериальных инфекций.

В УО ВГМУ разработана простая и доступная спектрофотометрическая методика количественной оценки β -лактамазной активности, основанная на неокупроиновой реакции.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Спектрофотометр СФ-46 или аналогичный.
2. Весы аналитические с дискретностью взвешивания 0,0002 г.
3. Весы лабораторные электронные с дискретностью взвешивания 0,02 г.
4. Термостат (37 °С).
5. Ионномер И-160 или аналогичный, укомплектованный стеклянным электродом и электродом сравнения.
6. Колбы стеклянные мерные.
7. Стаканы химические для приготовления буферного раствора.
8. Дозаторы пипеточные переменного объема 10–100 и 100–1000 мкл.
9. Пробирки пластиковые типа Эппендорф.
10. Кюветы фотометрические пластиковые одноразовые с длиной оптического пути 1 см.
11. Натрий уксуснокислый трехводный х.ч.
12. Кислота уксусная ледяная ч.д.а.
13. Натрия гидроокись х.ч.
14. Неокупроина гидрохлорид производства Sigma.
15. Медь (II) сернокислая пятиводная ч.д.а.
16. Ампициллина субстанция производства Sigma.
17. Бензилпенициллина (Penicillin G) субстанция производства Sigma.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Метод не может быть использован при уровне билирубина более 30 мкмоль/л и уровне глюкозы выше 12,0 ммоль/л.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА

Метод основан на реакции комплексообразования неокупроина, ионов меди (II) и разрушенной β -лактамной связи ампициллина и бензилпенициллина с образованием хромогена, имеющего максимум поглощения при 455 нм ($\epsilon=14300$).

Приготовление исходных растворов реагентов

Ацетатный буферный раствор (АБР): растворить 5,45 г натрия уксуснокислого трехводного в 170 мл дистиллированной воды в мерной колбе вместимостью 200 мл и довести дистиллированной водой до метки (раствор № 1). 2,4 мл ледяной уксусной кислоты поместить в мерную колбу вместимостью 200 мл и довести дистиллированной водой до метки (раствор № 2). 165 мл раствора № 1 смешать со 135 мл раствора № 2 и довести на иономере значение рН до 4,75. Хранить в холодильнике не более 3 мес.

Неокупроиновый реагент: растворить 20 мг неокупроина гидрохлорида в мерной колбе вместимостью 25 мл в ацетатном буферном растворе и довести им до метки (раствор А). Хранить в холодильнике; срок хранения 2 недели. Растворить 50 мг меди (II) сернокислой пятиводной в мерной колбе вместимостью 25 мл в ацетатном буферном растворе и довести им до метки (раствор Б). Хранить в холодильнике; срок хранения 4 недели. В день проведения исследования смешать растворы А и Б в соотношении 1:1.

Раствор натрия гидроокиси (0,2 М): навеску 0,8 г натрия гидроокиси растворить в мерной колбе вместимостью 100 мл и довести дистиллированной водой до метки.

Раствор ампициллина: точную навеску ампициллина (0,1500 г) растворить в мерной колбе (50 мл) в дистиллированной воде. 1,5 мл полученного раствора поместить в мерную колбу вместимостью 25 мл и довести дистиллированной водой до метки.

Раствор бензилпенициллина: точную навеску бензилпенициллина (0,1500 г) растворить в мерной колбе (50 мл) в дистиллированной воде. 1,5 мл полученного раствора поместить в мерную колбу вместимостью 25 мл и довести дистиллированной водой до метки.

Проведение основного опыта

Приготовление стандартной пробы каждого из антибиотиков. В пластиковые кюветы (проводить в дуплете) внести по 50 мкл растворов ампициллина (Аmp) и/или бензилпенициллина (ВР). Затем в каждую кювету добавить по 50 мкл 0,2 М раствора натрия гидроокиси и инкубировать при $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 мин. Затем в каждую кювету внести 400 мкл АБР и 500 мкл неокупроинового реагента, инкубировать при комнатной температуре 30 мин. Спустя вышеуказанное время измерить оптическую плотность против реагентного бланка (100 мкл дистиллированной воды, 400 мкл АБР и 500 мкл неокупроинового реагента) при $\lambda = 455\text{ нм}$ (A_{st_Amp} и/или A_{st_BP}).

Определение. В 2 пластиковые кюветы внести по 50 мкл сыворотки крови. Затем в первую кювету добавить 50 мкл раствора ампициллина (Аmp) и/или бензилпенициллина (ВР) (опыт), а во вторую – 50 мкл дистиллированной воды (контроль). Инкубировать при $t = 37\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 15 мин. Затем в каждую кювету внести 400 мкл АБР и 500 мкл неокупроинового реагента, инкубировать при комнатной температуре 30 мин. Спустя вышеуказанное время измерить оптическую плотность первой и второй кюветы против реагентного бланка (100 мкл дистиллированной воды, 400 мкл АБР и 500 мкл неокупроинового реагента) при $\lambda = 455\text{ нм}$ (A_{o_Amp} и/или A_{o_BP} и A_k).

Расчет. Рассчитать процент разрушения β -лактамной связи ампициллина и бензилпенициллина по формулам:

$$\%_{Amp} = \frac{A_{o_Amp} - A_k}{A_{st_Amp}} \quad \text{и} \quad \%_{BP} = \frac{A_{o_BP} - A_k}{A_{st_BP}}$$

Оценка результатов. При уровне разрушения бензилпенициллина в крови более 90% и ампициллина более 70% рекомендуется изменение тактики антибактериальной терапии: назначение ингибитор-защищенных β -лактамов или антибиотиков из других фармакологических групп.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

1. Тест-объекты (модельные растворы антибиотиков) необходимо готовить в день испытания!
2. Неокупроиновый реагент готовится только *ex tempore* и хранению не подлежит!
3. При концентрации глюкозы в сыворотке крови выше 8,0 ммоль/л оптическая плотность контроля может достигать 0,6 ЕОП, что может привести к увеличению систематической и случайной погрешности, следовательно, испытуемую сыворотку рекомендуется разбавить в 2 раза с последующей корректировкой конечного результата.
4. При появлении мутности опытного или контрольного образца необходимо повторить испытание, сократив время инкубации после добавления неокупроинового реагента до 20 мин.