

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

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

Д. Л. Пиневич

04.11.2015

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-р мед. наук, доц. И. В. Жильцов, д-р мед. наук, проф. В. М. Семенов,
Т. А. Торосян, С. К. Егоров, С. И. Хайрулина

Витебск 2015

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) 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 β -лактамазной активности ротовой жидкости пациентов с ГВЗ ЧЛО с последующим назначением определенных антибактериальных препаратов в зависимости от выявленного уровня активности. Метод позволяет обнаружить и учесть устойчивость к антибиотикам β -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 β -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, сокращение продолжительности их пребывания в стационаре.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

1. Фотометр планшетного типа с набором фильтров 300–600 нм.
2. Одноразовый шприц медицинский с иглой (объем 2 мл).
3. Пробирки пластиковые типа «эппендорф».
4. Стерильные перчатки.
5. Холодильная установка.
6. Термостат (37 °C).
7. Центрифуга.
8. Дозаторы пипеточные переменного объема 10–100 и 100–1000 мкл.
9. Дистиллированная вода.
10. Фосфатный буферный раствор (ФБР) (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 β -лактамазной активности биологических субстратов путем учета распада нитроцефина.

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Антибактериальная терапия у пациентов 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 ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

Метод основан на определении изменения окраски синтетического антибиотика цефалоспоринового ряда нитроцефина при распаде его β -лактамной связи. При этом происходит батохромный сдвиг в хромофорной системе молекулы, и окраска реакционной смеси изменяется с желтой на красно-оранжевую. Максимум поглощения продукта реакции растет с 390 на 486 нм, что и делает возможным спектрофотометрическую детекцию. β -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 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ в пробирках типа «эппендорф» в течение 1 мес. Непосредственно перед исследованием все пробы необходимо одновременно разморозить (если они замораживались), после чего их центрифугируют при 10 000 об/мин в течение 5 мин. По окончании центрифугирования отделяют прозрачный надсадок ротовой жидкости, который и используют для измерения уровня β -лактамазной активности.

Для приготовления опытных образцов 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 в лунки иммунологического планшета вносят 100 мкл испытуемого образца ротовой жидкости и прибавляют 100 мкл воды дистиллированной.

Для приготовления реагентного бланка 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 в лунки иммунологического планшета вносят 20 мкл раствора пенициллиназы (10 000 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 жидкость (мкл)	Раствор пенициллиназы (мкл)	Вода дистиллированная (мкл)	Раствор нитроцефина (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 °С в течение 120 мин. 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 β -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 β -лактамазной активности ротовой жидкости от 40 до 70 % следует считать соответствующим возможному наличию устойчивости к β -лактамам антибиотикам первой линии (пенициллинам и цефалоспорином 1 и 2 поколения, незащищенным аминопенициллинам, цефалоспорином 3 поколения), а ≥ 70 % — вероятному наличию устойчивости к данным антибактериальным средствам. Общий риск неудачи стартовой эмпирической этиотропной терапии у пациентов с β -лактамазной активностью ротовой жидкости ≥ 40 % в 3–12 раз, а с активностью ≥ 70 % — в 4–14 раз выше, чем у пациентов с β -лактамазной активностью ротовой жидкости < 40 %.

Соответственно, при уровне β -лактамазной активности ротовой жидкости пациентов с ГВЗ ЧЛО в пределах 40–70 % следует рекомендовать назначение ингибитор-защищенных β -лактамов и/или антибиотиков из других фармакологических групп с аналогичным спектром действия (цефалоспоринов 4 поколения, карбапенемов, фторхинолонов, аминогликозидов и др.), а при

показателе $\geq 70\%$ 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 β -лактамазной активностью, но она существенно ниже, чем у бактериальных β -лактамаз. Тем не менее, ЧСА в концентрации, превышающей 3–5 мг/мл, может вносить существенную погрешность в результаты измерений, увеличивая регистрируемый уровень β -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 мин. Рассчитано, что 1 мл взвеси селективно связывает ≥ 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 мин.

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 мин, увеличив при необходимости скорость вращения центрифуги вплоть до 14 500 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 объему проб и существенному снижению точности определения β -лактамазной активности (пробы различного объема можно заметить при внешнем осмотре иммунологического планшета).

Возможные пути устранения:

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

4. На поверхности жидкости в лунке иммунологического планшета имеется пузырек 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 объемом 2...20 мкл, предварительно надев на нее чистый наконечник.

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

Возможные пути устранения:

никогда не использовать реагенты с истекшим сроком годности.

6. Микроскопические капли раствора пенициллиназы, используемого для приготовления контролем полного распада нитроцефина, попали в лунки иммунологического планшета с анализируемыми образцами. В результате в некоторых пробах случайным образом выявляется необычно высокий уровень β -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 β -лактамазную активность одного образца ротовой жидкости минимум дважды (т. е. дублировать пробы), чтобы можно было выявить необычно высокую внутриэкспериментальную 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 ее рабочий раствор в стороне от основной рабочей зоны (например, на другом столе).