

ТЕСТ-СИСТЕМА БИОЛАКТАМ**для определения бета-лактамазной активности биологических субстратов***инструкция по применению***Область применения**

Тест-система БИОЛАКТАМ (ТУ ВУ 391353648.001–2011, далее - тест-система) предназначена для определения бета-лактамазной активности биологических субстратов. Область применения тест-системы – клиническая медицина.

Комплектность тест-системы

Наименование компонента	Количество
Маркированный флакон, содержащий субстрат-хромоген 125 мкг (Флакон 1)	1 шт.
Маркированный флакон, содержащий компоненты фосфатного буферного раствора 0,1 М (Флакон 2)	1 шт.
Маркированный флакон, содержащий 10 000 ЕД пенициллиназы, для приготовления катализирующего раствора (Флакон 3)	1 шт.
Планшет иммунологический	1 шт.
Подложка с цветовой индикацией для разметки иммунологического планшета	1 шт.

Определение бета-лактамазной активности сыворотки крови**Приготовление рабочих растворов**

- Приготовление буферного раствора – во Флакон 2 добавить 4,6 мл воды дистиллированной, интенсивно перемешать до полного растворения.
- Приготовление маточного раствора субстрата-хромогена - во Флакон 1 поместить 500,0 мкл буферного раствора, осторожно перемешать 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 прибавить 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 внести 100 мкл воды дистиллированной и осторожно перемешать 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 внести 20 мкл сыворотки крови и прибавить 180 мкл Хромогена.
- Для приготовления контрольных образцов мутности в лунки иммунологического планшета внести 20 мкл сыворотки крови и прибавить 180 мкл воды дистиллированной.
- Для приготовления образцов Полного Распада (ПР) в лунки иммунологического планшета внести 20 мкл Пенициллиназы и прибавить 180 мкл Хромогена.
- Для приготовления Реагентного Бланка (РБ) в лунки иммунологического планшета внести 20 мкл воды дистиллированной и прибавить 180 мкл Хромогена.

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

- Все приготовленные образцы инкубировать в термостате (37°C) в течение 30 минут.
- Измерить оптическую плотность на планшетном ридере (светофильтр 492 (505) нм) против воздуха.

Определение бета-лактамазной активности бактериальной взвеси, ротовой жидкости, ликвора.**Приготовление рабочих растворов**

- Приготовление буферного раствора – во Флакон 2 добавить 4,6 мл воды дистиллированной, интенсивно перемешать до полного растворения.
- Приготовление маточного раствора субстрата-хромогена - во Флакон 1 поместить 500,0 мкл буферного раствора, осторожно перемешать 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 прибавить 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 внести 100 мкл воды дистиллированной и осторожно перемешать 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 внести 100 мкл испытуемого биологического субстрата (культуральная взвесь, спинномозговая жидкость или ротовая жидкость) и прибавить 100 мкл Хромогена.
- Для приготовления контрольных образцов мутности в лунки иммунологического планшета внести 100 мкл биологического субстрата и прибавить 100 мкл воды дистиллированной.
- Для приготовления образцов полного распада в лунки иммунологического планшета внести 20 мкл Пенициллиназы, 80 мкл воды дистиллированной и прибавить 100 мкл Хромогена.
- Для приготовления реagentного бланка в лунки иммунологического планшета внести 100 мкл воды дистиллированной и прибавить 100 мкл Хромогена.

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

- Все приготовленные образцы инкубировать в термостате (37°C) в течение 120 минут.
- Измерить оптическую плотность на планшетном ридере (светофильтр 492 (505) нм.) против воздуха.

Учет результатов

Для каждого образца рассчитать активность по формуле:

$$A = \frac{(O - K) - (PB - PJA)}{PP - PJA} \times 100$$

где:

- А – искомая бета-лактамазная активность опытных образцов;
- О – оптическая плотность опытных образцов;
- К – оптическая плотность контрольных образцов;
- РБ – оптическая плотность Реagentного Бланка;
- ПР – среднее значение оптических плотностей Полного Распада;
- ПЯ – среднее значение оптических плотностей пустых ячеек.

Учет результатов рекомендуется проводить с помощью программного обеспечения, адаптированного к ИФА-анализатору производства ОАО «Витязь», Республика Беларусь (фотометра универсального Ф300 ТП либо моделей с совместимым набором команд управления).

Учитываемые критерии

- Для сыворотки крови – при А более 68,2% Полного Распада субстрата-хромогена рекомендуется коррекция проводимой больному антибактериальной терапии (назначение ингибитор-защищенных бета-лактамов либо антибиотиков из других фармакологических групп со сходным спектром активности).
- Для ротовой жидкости - при А более 60,0% Полного Распада субстрата-хромогена указывает на необходимость вышеописанной коррекции антибактериальной терапии.
- Для бактериальной взвеси – при А более 8,7% Полного Распада субстрата-хромогена необходимо считать, что данная бактериальная культура продуцирует клинически значимые количества бета-лактамаз, что приводит к существенному снижению эффективности антибиотиков бета-лактаминового ряда. Если же А превышает 13,4%, то данная бактериальная культура должна также считаться устойчивой и к ингибитор-защищенным бета-лактамам.
- Для ликвора - А более 40,0% Полного Распада субстрата-хромогена при отсутствии у больного субарахноидального кровоизлияния указывает на необходимость вышеописанной коррекции антибактериальной терапии.

Ограничения методики

- Тест-система не позволяет дифференцировать обычные бета-лактамазы, продуцируемые бактериями, от бета-лактамаз расширенного спектра действия (БЛРС, ESBL), поскольку и те, и другие эффективно разрушают субстрат-хромоген.
- Количественные показатели вышеприведенных критериев могут корректироваться по мере поступления, обработки и анализа новых клинико-лабораторных данных из различных регионов.