

МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА И ПРОДОВОЛЬСТВИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УЧРЕЖДЕНИЕ ОБРАЗОВАНИЯ  
«ВИТЕБСКАЯ ОРДЕНА «ЗНАК ПОЧЕТА» ГОСУДАРСТВЕННАЯ  
АКАДЕМИЯ ВЕТЕРИНАРНОЙ МЕДИЦИНЫ»

**Кафедра эпизоотологии и инфекционных болезней**

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕТА-ЛАКТАМАЗНОЙ АКТИВНОСТИ  
БИОЛОГИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-СИСТЕМЫ  
«БИОЛАКТАМ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Витебск  
ВГАВМ  
2022

УДК 619:616.9-07:611.018.54

ББК 48.731

О62

Утверждены заместителем Министра - Директором Департамента  
ветеринарного и продовольственного надзора Министерства  
сельского хозяйства и продовольствия Республики Беларусь  
23 декабря 2019 г., № 03-02/13610

Авторы:

ассистент кафедры эпизоотологии *Д. С. Конотоп*;  
доктор ветеринарных наук, профессор *Р. Г. Кузьмич*;  
доктор ветеринарных наук, профессор *В. В. Максимович*;  
доктор медицинских наук, профессор *В. М. Семенов*;  
аспирант *С. В. Семенов*

Рецензенты:

доктор ветеринарных наук, профессор *А. П. Медведев*,  
кандидат ветеринарных наук, доцент *В. Н. Иванов*

**О62** **Определение бета-лактамазной активности биологических  
субстратов с использованием тест-системы «Биолактан» :**  
методические рекомендации / *Д. С. Конотоп [и др.]*. – Витебск : ВГАВМ,  
2022. – 12 с.

Методические рекомендации предназначены для работников  
ветеринарных лабораторий, ветеринарных врачей, студентов ветеринарных  
факультетов, а также слушателей ФПК и ПК, специалистов АПК.

**УДК 619:616.9-07:611.018.54**

**ББК 48.731**

© УО «Витебская ордена «Знак Почета»  
государственная академия ветеринарной  
медицины», 2022

## 1. Введение

1.1. Настоящие Методические рекомендации устанавливают порядок определения бета-лактамазной активности биологических субстратов.

1.2. Методические рекомендации предназначены для применения в ветеринарных лабораториях Республики Беларусь.

1.3. Методические рекомендации являются обязательными для определения степени биологической резистентности организма животных и птицы к бета-лактамам антибиотикам. Полученные результаты могут использоваться ветеринарными специалистами для рационального назначения антибактериальных препаратов с лечебно-профилактической целью в животноводстве и птицеводстве.

1.4. Методические рекомендации разработаны с целью обеспечения единого методического подхода для определения биологической резистентности к бета-лактамам антибиотикам в организме животных и птицы с учетом выявленного количественного уровня бета-лактамазной активности.

## 2. Область применения

Методические рекомендации содержат описание методов определения бета-лактамазной активности в биологических субстратах. В основе функционирования тест-системы «БИОЛАКТАМ» лежит хроматографическая методика, базирующаяся на изменении 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.

## 3. Аппаратура, материалы, лабораторная посуда, реактивы

### 3.1. Аппаратура

Холодильник бытовой электрический

Термостат

Планшетный ридер (светофильтр 492 (505) нм) против воздуха.

Микроцентрифуга настольная типа Эппендорф  
(частота вращения не менее 13000 мин.)

Дистиллятор, обеспечивающий качество дистиллированной воды

Дозаторы с переменным объемом дозирования:

2 - 20 мкл с шагом 0,01 мкл, с точностью +/- 0,8%;

20 - 200 мкл с шагом 0,1 мкл, с точностью +/- 0,6%;

100 - 1000 мкл с шагом 1 мкл, с точностью +/- 3%.

Допускается использование другой аппаратуры и инструментов с техническими характеристиками не хуже указанных выше, отечественного и зарубежного производства, разрешенных для применения в установленном порядке.

### 3.2. Лабораторная посуда и материалы

Бумага фильтровальная лабораторная .....	ГОСТ 12026-76
Стакан химический вместимостью 100, 150, 250, 400 мл	ГОСТ 25336-82
Колбы стеклянные мерные плоскодонные конические вместимостью 100, 250, 500, 1000 мл	ГОСТ 12738-77
Цилиндры стеклянные мерные лабораторные вместимостью 50, 100, 250, 500 мл	ГОСТ 1770-74
Пробирки микроцентрифужные типа Эппендорф вместимостью 1,5 мл	
Наконечники с фильтром для дозаторов с переменным объемом дозирования до: 10; 20; 200; 1000 куб. мм;	

### 3.3. Реактивы

Вода дистиллированная	ГОСТ 6709-72
-----------------------	--------------

## 4. Подготовка к анализу

### 4.1. Отбор проб, подготовка образцов

- Отбор крови следует производить до кормления согласно общепринятым методикам отбора для каждого вида животных и птицы. После получения кровь следует поставить в теплое место или термостат для лучшего отделения сыворотки. Другие биологические субстраты получать согласно общепринятым утвержденным методикам.

- Сыворотки крови могут храниться при температуре 2-8°C в течение одной недели при условии отсутствия микробной контаминации. Допускается замораживать образцы, обеспечивая условия хранения при -18°C или -20°C. Образцы могут подвергаться замораживанию/оттаиванию только однократно, так как повторное замораживание/оттаивание может приводить к неправильным результатам.

- Образцы, содержащие осадок или после разморозки, перед постановкой анализа следует подвергать центрифугированию в течение 5-10 минут при 3-5 (до 10) тыс. об./мин.

- Для отбора образцов, компонентов тест-системы использовать автоматические пипетки с погрешностью измерения не более 5%.

#### 4.2. Меры предосторожности

Достоверность результатов зависит от правильного выполнения следующих правил:

1. не использовать реагенты с истекшим сроком годности;
2. перед использованием необходимо выдержать реагенты 30 минут при комнатной температуре (18-25) °С;
3. аккуратно разводить реагенты, избегая любого загрязнения;
4. не допускать вспенивания содержимого в лунках иммунологического планшета;
5. использовать для внесения каждой пробы чистый стерильный наконечник;
6. использовать только поверенные пипетки и оборудование;
7. не изменять последовательности проведения исследования, изложенного в инструкции;
8. если допущена ошибка при внесении образцов или реагентов в лунку, такую лунку бракуют;
9. компоненты тест-системы лиофильно высушенные, поэтому вскрытие флаконов проводить осторожно, не допуская выброса содержимого вследствие разности давления;
10. при приготовлении катализирующего раствора рекомендуется сразу не вскрывать флакон с пенициллиназой, а с помощью инсулинового шприца осторожно, прокалывая иглой резиновую пробку под прямым углом, внести необходимое количество воды дистиллированной для полного растворения фермента; после этого допускается вскрыть флакон.

Ложноположительные результаты могут быть обусловлены:

- А) получением неправильно приготовленных рабочих растворов;
- Б) нарушением регламента раскапывания компонентов и образцов в лунки не соответствующие цветной индикации на подложке для разметки иммунологического планшета.

### 5. Проведение анализа

(на 20 определений)

#### Определение бета-лактамазной активности сыворотки крови

##### *Приготовление рабочих растворов*

- Для приготовления *буферного* раствора во Флакон 2 добавить 4,6 мл воды дистиллированной, интенсивно перемешать до полного растворения.
- Для получения *маточного раствора субстрата-хромогена* во Флакон 1 поместить 500,0 мкл приготовленного на предыдущем этапе буферного раствора, осторожно перемешать до полного растворения субстрата-хромогена. Маточный раствор допускается хранить в морозильной камере при -18°С в течение 1 месяца.

- Для приготовления *рабочего раствора субстрата-хромогена* (далее «Хромоген») – к ранее 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).

- Для получения *катализирующего раствора* (далее «Пенициллиназа») – во Флакон 3 с помощью инсулинового шприца аккуратно 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 1, 3, 5 ряда иммунологического планшета (зеленый цвет) внести 20 мкл сыворотки крови и прибавить 180 мкл Хромогена.

- Для приготовления контрольных образцов мутности в лунки 2, 4, 6 ряда иммунологического планшета (оранжевый цвет) внести 20 мкл сыворотки крови и прибавить 180 мкл воды дистиллированной.

- Для приготовления образцов Полного Распада (ПР) в лунки иммунологического планшета (красный цвет) внести 20 мкл Пенициллиназы и прибавить 180 мкл Хромогена.

- Для приготовления Реагентного Бланка (РБ) в лунки иммунологического планшета (желтый цвет) 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 и биологических субстратов**

### *Приготовление рабочих растворов*

- Для приготовления *буферного* раствора – во Флакон 2 добавить 4,6 мл воды дистиллированной, интенсивно перемешать до полного растворения.
- Для получения *маточного раствора субстрата-хромогена* - во Флакон 1 поместить 500,0 мкл приготовленного на предыдущем этапе буферного раствора, осторожно перемешать до растворения субстрата-хромогена. Маточный раствор допускается хранить в морозильной камере при  $-18^{\circ}\text{C}$  в течение 1 месяца.
- Для приготовления *рабочего раствора субстрата-хромогена* (далее «Хромоген») – к ранее 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).
- Для получения *катализирующего раствора* (далее «Пенициллиназа») – во Флакон 3 с помощью инсулинового шприца аккуратно 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 1, 3, 5 ряда иммунологического планшета (зеленый цвет) внести 100 мкл испытуемого биологического субстрата (культуральная взвесь и др.) и прибавить 100 мкл Хромогена.
- Для приготовления контрольных образцов мутности в лунки 2, 4, 6 ряда иммунологического планшета (оранжевый цвет) внести 100 мкл биологического субстрата и прибавить 100 мкл воды дистиллированной.
- Для приготовления образцов Полного Распада (ПР) в лунки иммунологического планшета (красный цвет) внести 20 мкл Пенициллиназы, 80 мкл воды дистиллированной и прибавить 100 мкл Хромогена.
- Для приготовления Реагентного Бланка (РБ) в лунки иммунологического планшета (желтый цвет) внести 100 мкл воды дистиллированной и прибавить 100 мкл Хромогена.
- Все приготовленные образцы инкубировать в термостате ( $37^{\circ}\text{C}$ ) в течение 120 минут.
- Измерить оптическую плотность на планшетном ридере (светофильтр 492 (505) нм.) против воздуха.

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

## 6. Учет результатов

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).

Для каждого образца рассчитать активность по формуле:

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

где А – искомая бета-лактамазная активность опытных образцов;

О – оптическая плотность опытных образцов;

К – оптическая плотность контрольных образцов;

РБ – среднее значение оптических плотностей Реагентного Бланка;

ПР – среднее значение оптических плотностей Полного Распада;

ПЯ – среднее значение оптических плотностей пустых ячеек.

## 7. Учитываемые критерии

- Для сыворотки крови свиней – при А более 41,3 % Полного Распада субстрата-хромогена рекомендуется коррекция антибактериальной терапии.
- Для сыворотки крови КРС – при А более 34,7%;
- Для сыворотки крови лошадей – при А более 58,6%;
- Для сыворотки крови собак – при А более 63,5%;
- Для сыворотки крови кошек – при А более 33,8%;
- Для сыворотки крови птиц – при А более 32,6%;
- 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.

## 8. Интерпретация результатов анализа

Факт обнаружения биологической резистентности (с учетом уровня бета-лактамазной активности) в организме животных и птицы можно расценивать как рутинный физиологический показатель. Однако **количественный уровень** бета-лактамазной активности имеет конкретное прогностическое значение (Приложение 1).

Следует также учитывать индивидуальный или групповой характер исследования и принимать соответствующее правильное решение.

Получение значения А (полный распад субстрата-хромогена) выше значения, указанного в учитываемых критериях для каждого вида животных и птицы, свидетельствует о **высокой** степени биологической резистентности.

Следует произвести замену используемых бета-лактамных антибиотиков на препараты из других групп (фторхинолоны, тетрациклины, макролиды и т.д.).

При получении значения А (полный распад субстрата-хромогена) в пределах до 10% в сторону уменьшения к значению, указанному в учитываемых критериях, уровень бета-лактамазной активности следует считать **повышенным** (критическим). Необходимо проводить коррекцию антибактериальной терапии, назначая ингибиторзащищенные бета-лактамы (содержащие в своем составе клавулановую кислоту) или антибактериальные препараты других фармакологических групп.

При получении значения А (полный распад субстрата-хромогена) свыше 10% в сторону уменьшения к значению, указанному в учитываемых критериях, уровень бета-лактамазной активности следует считать **нормальным**. В данном случае не требуется замены бета-лактамных антибиотиков, терапевтический эффект их применения будет максимально возможным.

Совокупность результатов анализа, терапевтической эффективности применяемых согласно технологии выращивания антибиотиков, показателей продуктивности позволяют максимально эффективно проводить лечебно-профилактические ветеринарные мероприятия.

## 9. 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.

## 10. Правила работы для персонала

1. Работы по определению бета-лактамазной активности могут проводить сотрудники любых отделов ветеринарных лабораторий, имеющих соответствующую квалификацию.

2. Необходимо использовать индивидуальный набор соответствующего лабораторного оборудования, расходных материалов и одежды. Одноразовые перчатки подлежат смене при каждой новой операции. Работа без перчаток запрещена.

3. Запрещается перемещать личные вещи, лабораторные журналы, лабораторную одежду и канцелярские принадлежности между разными отделами лаборатории.

#### *Работа с оборудованием*

1. Мини-центрифуги, вортексы, штативы для пробирок, автоматические пипетки, термостаты и маркерные карандаши являются принадлежностями определенного рабочего места и перемещению с места на место не подлежат.

2. Сменные наконечники для пипеток и полипропиленовые пробирки разрешается использовать только из заводской упаковки. Автоклавирование одноразового пластика не производится.

3. Использованные стеклянные флаконы, тару, упаковку следует утилизировать как бытовые отходы, согласно утвержденным в лаборатории инструкциям. Использованные планшеты и наконечники обеззараживаются путем погружения в емкости с дезинфицирующими средствами, в последующем утилизируются в соответствии с требованиями нормативных документов.

## **11. Организация рабочих мест**

#### *Общие требования*

1. Исследования по определению бета-лактамазной активности биологических субстратов могут проводиться на базе лабораторий, проводящих исследования биологического материала от животных и птицы. При организации исследований необходимо предусмотреть наличие вспомогательных помещений (комнаты ведения учетной документации; раздевалки для сотрудников, комнаты приема пищи, туалеты, подсобные помещения), которые могут быть общими с другими подразделениями учреждения. Курение и прием пищи на рабочих местах строго запрещены. Для приема пищи выделяется отдельное помещение, вход в которое в лабораторной одежде запрещен.

2. Для сотрудников лаборатории должна быть предусмотрена спецодежда: медицинский халат, шапочка, перчатки и сменная обувь.

3. По окончании работ рабочие поверхности обрабатывают дезинфицирующими растворами. Перед началом работ рабочую поверхность столов допускается дополнительно обрабатывать 70%-ным этиловым спиртом.

### **Нормативные ссылки**

ТУ ВУ 391353648.001-2011 Тест-система «Биолактам» для определения бета-лактамазной активности биологических субстратов

## Количественный уровень бета-лактамазной активности сыворотки крови

Вид животного, птицы	<b>Высокий уровень</b> (Процент полного распада субстрата-хромогена, %)	<b>Повышенный уровень</b> (Процент полного распада субстрата-хромогена, %)	<b>Нормальный уровень</b> (Процент полного распада субстрата-хромогена, %)
Свиньи	34,7 и выше	24,7 – 34,6	ниже 24,7
Крупный рогатый скот	41,3 и выше	31,3 – 41,2	ниже 31,3
Лошади	58,6 и выше	48,6 – 58,5	ниже 48,6
Собаки	63,5 и выше	53,5 – 63,4	ниже 53,5
Кошки	33,8 и выше	23,8 – 33,7	ниже 23,8
Цыплята-бройлеры	32,6 и выше	22,6 – 32,5	ниже 22,6

Нормативное производственно-практическое издание

**Конотоп** Денис Семенович,  
**Кузьмич** Ростислав Григорьевич,  
**Максимович** Владимир Васильевич и др.

# **ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕТА-ЛАКТАМАЗНОЙ АКТИВНОСТИ БИОЛОГИЧЕСКИХ СУБСТРАТОВ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ТЕСТ-СИСТЕМЫ «БИОЛАКТАМ»**

**МЕТОДИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ**

Ответственный за выпуск Д. С. Конотоп  
Технический редактор О. В. Луговая  
Компьютерный набор Д. С. Конотоп  
Компьютерная верстка Т. А. Никитенко  
Корректор Т. А. Никитенко

Подписано в печать 20.01.2022. Формат 60×84 1/16.  
Бумага офсетная. Ризография.  
Усл. печ. л. 0,75. Уч.-изд. л. 0,48. Тираж 100 экз. Заказ 2214.

Издатель и полиграфическое исполнение:  
учреждение образования «Витебская ордена «Знак Почета»  
государственная академия ветеринарной медицины».  
Свидетельство о государственной регистрации издателя, изготовителя,  
распространителя печатных изданий № 1/ 362 от 13.06.2014.  
ЛП №: 02330/470 от 01.10.2014 г.  
Ул. 1-я Доватора, 7/11, 210026, г. Витебск.  
Тел.: (0212) 48-17-82.  
E-mail: rio@vsavm.by  
<http://www.vsavm.by>