

# МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л.Пиневич

2018 г.

Регистрационный № 065-0618

## МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЛИЗОЦИМА

Инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ – РАЗРАБОТЧИКИ: учреждение образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», государственное учреждение «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доцент Окулич В.К., Земко В.Ю., Гончарова А.И., д-р мед. наук Дзядзько А.М.

Витебск – Минск, 2018

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д. Л. Пиневич

14.12.2018

Регистрационный № 065-0618

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЛИЗОЦИМА**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: УО «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет», ГУ «Минский научно-практический центр хирургии, трансплантологии и гематологии»

АВТОРЫ: канд. мед. наук, доц. В. К. Окулич, В. Ю. Земко, А. И. Гончарова, д-р мед. наук. А. М. Дзядзько

Витебск, Минск 2018

В настоящей инструкции по применению (далее — инструкция) представлен метод определения активности лизоцима, который может быть использован для оценки состояния неспецифической противоинойфекционной резистентности организма.

Область применения: лаборатории поликлиник и стационаров.

### **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

1. Весы лабораторные по ГОСТ 19491-74.
2. Разновесы по ГОСТ 7328-65.
3. Колбы стеклянные с градуированной горловиной по ГОСТ 12738-77.
4. Автоматические дозаторы лабораторные переменного объема: 20–200, 200–1000 мкл.
5. Пробирки стеклянные по ГОСТ 10515-75.
6. Многоканальный спектрофотометр со светофильтром 495 нм.
7. Термостат электрический с автоматическим терморегулятором и ценой деления 0,1 °С.
8. Холодильник-морозильник (от 4 до 8 °С, от -18 до -22 °С).
9. рН-метр лабораторный.
10. 96-луночный плоскодонный полистироловый планшет.
11. Вода дистиллированная по ГОСТ 6709-72.
12. Центрифуга лабораторная на 10 000 об/мин.
13. Центрифуга рефрижераторная на 1 000–5 000 об/мин.
14. Одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки типа «эппендорф» объемом 1,0 мл).
15. Натрий хлористый (NaCl) по ГОСТ 4233-77.
16. Субстрат пептидогликана, меченный 2 % конго красным.
17. Калий фосфорнокислый однозамещенный (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) по ГОСТ 4198-75.
18. Натрий фосфорнокислый двухзамещенный двухводный (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O) по ГОСТ 4172-76.
19. 0,06 М фосфатный буферный раствор pH 6,0.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Метод, изложенный в настоящей инструкции, показан для оценки неспецифической противоинойфекционной резистентности организма.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют.

### **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

1. Сбор биологической жидкости (крови, мокроты, ротовой жидкости).

Для исследования используют кровь, мокроту, ротовую жидкость. Кровь следует забирать натощак до начала лечения антибиотиками с 8 до 9 ч утра из локтевой вены, центрифугировать со скоростью 1500 об/мин в течение 10 мин для получения сыворотки. Мокроту, ротовую жидкость следует забирать натощак

2 раза в течение срока госпитализации: одна проба — в день поступления в стационар до начала лечения антибиотиками; вторая проба — в первый день клинического выздоровления, совпадающий с выпиской пациента из стационара. Перед постановкой реакции биологическую жидкость следует собирать в стерильные маркированные пробирки типа «эппендорф», центрифугировать в течение 10 мин 10 000 об/мин.

#### 2. Приготовление 0,06 М фосфатного буферного раствора рН 6,0.

Для этого 1,59 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  следует растворить в 175,8 мл дистиллированной воды, добавить 0,29 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , разведенного в 24,2 мл дистиллированной воды.

#### 3. Постановка реакции для определения уровня активности лизоцима в биологической жидкости.

На каждую пробу отводится 2 пробирки «эппендорф»: одна — для опытной пробы и вторая — для контрольной. Для постановки опытной пробы в пробирку внести 300 мкл 0,06 М фосфатного буферного раствора рН 6,0; 100 мкл субстрата пептидогликана, меченного 2 % конго красным и 100 мкл биологической жидкости. Для постановки контрольной пробы в пробирку внести буферный раствор с соответствующей рН в количестве 300 мкл, 100 мкл 0,9 % раствора  $\text{NaCl}$  и 100 мкл биологической жидкости, чтобы исключить влияние оптической плотности биологической жидкости на результаты определения активности фермента. Для сыворотки крови произвести инактивацию комплемента нагреванием в течение 1 ч до температуры 56 °С. Далее инкубировать пробы в термостате при 37 °С в течение 24 ч. Пробы извлечь из термостата и центрифугировать при 10 000 об/мин в течение 10 мин (мокроту и сыворотку крови) и 500 об/мин в течение 10 с (ротовую жидкость) для осаждения оставшегося неразрушенного субстрата. Из надосадка взять в дублях по 150 мкл раствора и перенести в лунки 96-луночного полистиролового планшета, который поместить в многоканальный спектрофотометр Ф300, где при длине волны 492 нм (максимально близкой к 495 нм) определить оптическую плотность в лунках.

#### 4. Учет результатов реакции.

Результат для каждой пробы биологической жидкости вычислить путем расчета разницы между средними показателями двух опытных и двух контрольных проб.

Для пересчета итогового результата активности лизоцима в мкг/мл использовать следующую формулу:

$$X = 7318,72 * (E_{\text{опп}} - E_{\text{опк}})^{2,26}.$$

где X — количество лизоцима в мкг/мл;  
 $E_{\text{опп}}$  — оптическая плотность пробы;  
 $E_{\text{опк}}$  — оптическая плотность контроля.

#### 5. Интерпретация полученных результатов.

Пациентов, у которых уровень лизоцима  $\leq 175,26$  мкг/мл в сыворотке крови и/или  $\leq 106,37$  в мокроте, и/или  $> 340$  мкг/мл в ротовой жидкости, следует отнести

к группе лиц с низкой неспецифической противоинойфекционной резистентностью организма.

### **Время, затраченное на каждый этап методики (хронометрия)**

Этап постановки реакции	Время
Приготовление 0,06 М фосфатного буферного раствора рН 6,0	40 мин (1 раз в 1 мес.)
Приготовление раствора субстрата пептидогликана, меченного конго красным	8 ч (1 раз в квартал)
Постановка реакции (10 проб)	10 мин (при каждой постановке опыта)
Учет результатов реакции (10 проб)	10 мин
Клиническая интерпретация полученных данных	15 мин

### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

При определении активности лизоцима в биологической жидкости возможны следующие ошибки:

при неполном растворении реактивов произойдет изменение концентраций, что повлияет на конечный результат;

хранение фосфатного буферного раствора рН 6,0 не в холодильной камере при температуре  $06 \pm 2$  °С приведет к изменению параметров буферной системы и искажению результатов;

хранение субстрата пептидогликана, меченого 2 % раствором конго красного, не в морозильной камере при температуре  $-20 \pm 2$  °С приведет к изменению конечного результата вследствие распада субстрата.

Все компоненты, необходимые для определения лизоцима в биологической жидкости, являются малотоксичными; ограничений к применению метода не имеется.