

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ



УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Д.Л.Пиневиц

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. Пиневиц

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 (KH₂PO₄) по ГОСТ 4198-75.
18. Натрий фосфорнокислый двухзамещенный двухводный (Na₂HPO₄·2H₂O) 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 $\text{KН}_2\text{PО}_4$ 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 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 противoinфекционной 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 ± 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 ± 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.