


**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ
БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖАЮ
Первый заместитель Министра
Д.Л. Пиневич
« 23 » декабря 2015 г.
Регистрационный № 022-0415



**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ЭЛСТАЗЫ РОТОВОЙ
ЖИДКОСТИ ДЛЯ ДИАГНОСТИКИ ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ
ЗАБОЛЕВАНИЙ ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ
(Инструкция по применению)**

**УЧРЕЖДЕНИЕ РАЗРАБОТЧИК: УО «Витебский государственный ордена
Дружбы народов медицинский университет»**

**АВТОРЫ: к.м.н., доцент А.А. Кабанова, к.м.н., доцент В.К. Окулич,
А.И. Гончарова, Н.Э. Колчанова, Д.Е. Корнеева**

Витебск, 2015

В настоящей инструкции по применению (далее инструкция) представлен метод определения эластазной активности ротовой жидкости, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на диагностику гнойно-воспалительных заболеваний челюстно-лицевой области.

Область применения: отделения челюстно-лицевой хирургии областных стационаров, стоматологические поликлиники, лаборатории поликлиник и стационаров.

Показания к применению

1. периостит челюстей (K10.22),
2. сиалоаденит (K11.2),
3. флегмоны челюстно-лицевой области (K12.2, L03.2),
4. хронический генерализованный пародонтит (K05.31).

Противопоказания

Отсутствуют.

Перечень необходимых медицинских изделий, реактивов, инструментария:

- весы лабораторные по ГОСТ 19491 – 74;
- разновесы по ГОСТ 7328 – 65;
- колбы стеклянные с градуированной горловиной по ГОСТ 12738 – 77;
- многоканальный спектрофотометр со светофильтром 495 нм;
- термостат электрический с автоматическим терморегулятором и ценой деления 0,1°C;
- холодильная камера с температурой +4°C, морозильная камера с температурой – 20°C;
- центрифуга лабораторная (10000 об/мин);
- автоматические регулируемые пипетки со стерильными наконечниками вместимостью 100-1000 мкл, 20-200 мкл;
- рН-метр;
- пробирки стеклянные по ГОСТ 10515 – 75;
- 96-луночный плоскодонный полистироловый планшет;
- пробирки пластиковые типа «Эппендорф» по 1,5 мл;
- вода дистиллированная по ГОСТ 7609 – 72;
- эластин-Конго красный (диаметр частиц 37-75 микрон);
- трис-HCl буфер с рН 7,4;

Описание технологии метода:

1. Сбор ротовой жидкости.

Для исследования использовать ротовую жидкость, полученную за час до еды. Перед постановкой реакции ротовую жидкость следует собирать в стерильные маркированные эппендорфы, центрифугировать в течение 10 минут 10 тыс.об/мин.

2. Приготовление 0,2 М солянокислого трис-НСI буфера с рН-7,4.

Соль трис (гидроксиметил) аминотетан в количестве 6,057 мг растворить в 50 мл дистиллированной воды, добавить 42 мл 0,1 М соляной кислоты и довести с помощью рН-метра до 7,4. Хранить при +4°C не более месяца.

3. Приготовление раствора субстрата.

Эластин-Конго красный взвесить 0,8 мг и растворить в 1 мл 0,2 М солянокислого трис-буфера с рН 7,4. На одну реакцию требуется 400 мкл раствора субстрата. Приготовленный раствор не хранить.

4. Постановка реакции для определения эластазной активности ротовой жидкости.

На каждую пробу отводится 2 эппендорфа: 1 – для опытной пробы и 2 – для контрольной пробы. Для постановки опытной пробы в эппендорф вносится 400 мкл раствора эластин-Конго красного на трис-НСI буфере рН 7,4 и 100 мкл ротовой жидкости. Для постановки контрольной пробы в эппендорф вносится буферный раствор с соответствующим рН в количестве 400 мкл и 100 мкл ротовой жидкости, чтобы исключить влияние оптической плотности ротовой жидкости на результаты определения активности фермента. Далее проводится инкубация проб в термостате при 37°C в течение 20 ч. Пробы извлечь из термостата и центрифугировать в течение 10 мин 10 тыс. об/мин для осаждения оставшегося эластина-Конго красного в виде неразрушенных частиц. Из надосадка взять в дублях по 150 мкл раствора и перенести в лунки 96-луночного полистиролового планшета. Планшет поместить в многоканальный спектрофотометр, где при длине волны 492 нм определить оптическую плотность в лунках.

5. Учет результатов реакции.

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

Для перевода единиц оптической плотности ($E_{оп}$) в единицы измерения ферментативной активности (пикокаталы) использовать следующую формулу:

$$X(\text{пкат}) = (0,0027 + 1,7 * E_{оп})^2$$

Где X – искомый результат;

$E_{оп}$ – оптическая плотность пробы минус оптическая плотность контроля

Уровень активности эластазы ротовой жидкости выше 0,004 пкат является одним из диагностических критериев развития флегмон двух и более

клетчаточных пространств челюстно-лицевой области, т.е. указывает на распространенный гнойно-воспалительный процесс.»

Уровень активности нейтрофильной эластазы ротовой жидкости выше 0,0013 пкат и ниже 0,004 пкат является одним из диагностических критериев для таких заболеваний, как хронический генерализованный пародонтит, сиалоаденит, периостит, флегмоны челюстно-лицевой области одного клетчаточного пространства.

Время, затраченное на каждый этап методики (хронометраж)

Этап постановки реакции	Время
Приготовление 0,2 М трис-HCl буфера	40 минут (1 раз в месяц)
Приготовление раствора субстрата	20 минут (при каждой постановке опыта)
Постановка реакции (10 проб)	10 минут (при каждой постановке опыта)
Учет результатов реакции (10 проб)	10 минут

ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ И ОШИБКИ

1. При неполном растворении реактивов произойдет изменение концентраций, что может изменить конечный результат.

2. Хранение буфера не в холодильной камере при температуре $+4^{\circ}\text{C}$, может привести к изменению параметров буферной системы и активности фермента эластазы.