

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

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

Область применения: лаборатории поликлиник и стационаров.

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ

- весы лабораторные по ГОСТ 19491 – 74;
- разновесы по ГОСТ 7328 – 65;
- колбы стеклянные с градуированной горловиной по ГОСТ 12738 – 77;
- автоматические дозаторы лабораторные переменного объема: 20–200; 200–1000 мкл;
- пробирки стеклянные по ГОСТ 10515 – 75;
- многоканальный спектрофотометр со светофильтром 495 нм;
- термостат электрический с автоматическим терморегулятором и ценой деления 0,1 °С;
- холодильник-морозильник (+4 – +8°С , -18 – -22°С);
- рН-метр лабораторный;
- 96-луночный плоскодонный полистироловый планшет;
- вода дистиллированная по ГОСТ 6709 – 72;
- центрифуга лабораторная на 10000 оборотов в минуту;
- центрифуга рефрижераторная на 1000 – 5000 оборотов в минуту;
- одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,0 мл);
- натрий хлористый (NaCl) по ГОСТ 4233-77;

- субстрат пептидогликана, меченый 2% Конго красным;
- калий фосфорнокислый однозамещенный (KH_2PO_4) по ГОСТ 4198-75;
- натрий фосфорнокислый 2-замещенный 2-водный ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) по ГОСТ 4172-76;
- 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

Отсутствуют.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

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

Для исследования использовать кровь, мокроту, ротовую жидкость. Кровь забирать натощак до начала лечения антибиотиками с 8 до 9 часов утра из локтевой вены, центрифугировать со скоростью 1500 оборотов в минуту в течение 10 минут для получения сыворотки. Мокроту, ротовую жидкость забирать натощак 2 раза в течение срока госпитализации: 1 проба – в день поступления в стационар до начала лечения антибиотиками, 2 проба – в первый день клинического выздоровления, совпадающий с выпиской пациента из стационара. Перед постановкой реакции биологическую жидкость собирать в стерильные маркированные эппендорфы, центрифугировать в течение 10 минут 10000 оборотов в минуту.

2. Приготовление 0,06 М фосфатного буферного раствора pH 6,0.

1,59 г $\text{KН}_2\text{PО}_4$ 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 эппендорфа: 1 – для опытной пробы и 2 – для контрольной пробы. Для постановки опытной пробы в эппендорф внести 300 мкл 0,06 М фосфатного буферного раствора рН 6,0; 100 мкл субстрата пептидогликана, меченого 2% Конго красным и 100 мкл биологической жидкости. Для постановки контрольной пробы в эппендорф внести буферный раствор с соответствующим 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 провести инактивацию комплемента нагреванием в течение часа до температуры 56 °С. Далее провести инкубацию проб в термостате при 37 °С в течение 24 часов. Пробы извлечь из термостата и центрифугировать 10000 оборотов в минуту в течение 10 минут (мокроту и сыворотку крови) и 500 оборотов в минуту в течение 10 секунд (ротовую жидкость) для осаждения оставшегося неразрушенного субстрата. Из надосадка взять в дублях по 150 мкл раствора и перенести в лунки 96-луночного полистиролового планшета. Планшет поместить в многоканальный спектрофотометр Ф300, где при длине волны 492 нм (максимально близкой к 495 нм) определить оптическую плотность в лунках.

6. 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.

7. 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 пациентов с низкой неспецифической противомикробной резистентностью организма.

ВРЕМЯ, ЗАТРАЧЕННОЕ НА КАЖДЫЙ ЭТАП МЕТОДИКИ (ХРОНОМЕТРИЯ)

Этап постановки реакции	Время
Приготовление 0,06 М фосфатного буферного раствора рН 6,0	40 минут (1 раз в месяц)
Приготовление раствора субстрата пептидогликана, меченого Конго красным	8 часов (1 раз в квартал)
Постановка реакции (10 проб)	10 минут (при каждой постановке опыта)
Учет результатов реакции (10 проб)	10 минут
Клиническая интерпретация полученных данных	15 минут

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 изменит конечный результат;
- хранение фосфатного буферного раствора рН 6,0 не в холодильной камере при температуре $+6\pm 2$ °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 ± 2 °С приведет к изменению конечного результата вследствие распада субстрата.

ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА

Все компоненты необходимые для определения лизоцима в биологической жидкости являются малотоксичными. Ограничений к применению не имеется.