


МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ


УДВЕРЖАЮ
Первый заместитель Министра
..... Д.А. Пиневич
«24» 2017 г.
Регистрационный № i ч? - с в * -/

**СПОСОБ ОПРЕДЕЛЕНИЯ
РАСПРОСТРАНЕННОСТИ
ГНОЙНО-ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ПРОЦЕССА
ЧЕЛЮСТНО-ЛИЦЕВОЙ ОБЛАСТИ**

Инструкция по применению

Учреждение-разработчик: УО «Белорусский государственный медицинский университет», УО «Витебский государственный медицинский университет»

Авторы: д-р мед. наук, профессор И. О. Походенько-Чудакова, канд. мед. наук, доцент В. К. Окулич, А. А. Кабанова

В настоящей инструкции представлен способ определения распространенности гнойно-воспалительного процесса челюстно-лицевой области по уровню миелопероксидазы в ротовой жидкости.

Принцип метода. 2,2'-azinoNs(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) хромогенный субстрат для определения активности миелопероксидазы. Под действием фермента происходит расщепление перекиси водорода с выделением атомарного кислорода, который взаимодействует с хромогенным субстратом, изменяя его окраску с бесцветного до сине-зеленого.

Показания к применению

Стоматология. В диагностике заболевания челюстно-лицевой области используются различные биохимические методики, в том числе и определение уровня активности ферментов сыворотки крови и гораздо реже — ротовой жидкости. При воспалительных процессах в полости рта уровень активности миелопероксидазы по данным специальной литературы повышается. Предложенный метод позволяет определять уровень активности миелопероксидазы в кратчайшие сроки за счет простоты постановки реакции, что позволяет его использовать для ранней диагностики заболеваний челюстно-лицевой области. Определение уровня активности миелопероксидазы в ротовой жидкости может быть использовано для диагностики различных патологических состояний полости рта: заболеваний слизистой оболочки полости рта, воспалительных заболеваний тканей периодонта, гнойно-воспалительных процессов челюстей и околочелюстных мягких тканей. По уровню миелопероксидазы в ротовой жидкости можно определить распространенность гнойно-воспалительного процесса челюстно-лицевой области, что будет способствовать выбору оптимальной тактики хирургического лечения.

Клиническая лабораторная диагностика. Определение сывороточной миелопероксидазы используется давно и широко, как правило, для диагностики заболеваний системы кроветворения и воспалительных процессов в хирургии. Однако предложенный метод более прост в использовании и намного дешевле, так как является микрометодом, что расширяет возможности его использования и при других заболеваниях. Использование ротовой жидкости для определения уровня активности миелопероксидазы является неинвазивным методом. Определение уровня активности миелопероксидазы ротовой жидкости доступно для всех клинических (биохимических) лабораторий.

Перечень необходимого медицинского оборудования, реактивов, инструментария:

- весы равноплечие ручные ВР-100 по ГОСТ 395-54;
- весы лабораторные по ГОСТ 19491-74;
- разновесы по ГОСТ 7328-65;
- колбы стеклянные с градуированной горловиной по ГОСТ 12738-77;
- автоматические регулируемые пипетки со стерильными наконечниками вместимостью 100-1000 мкл, 20-200 мкл, 2-20 мкл;
- пробирки стеклянные по ГОСТ 10515-75;
- многоканальный спектрофотометр ФЗОО производства РУПП «Витязь» со светофильтром 405 нм;
- термостат электрический с автоматическим терморегулятором и ценой деления 0,1 °С;
- холодильная камера с температурой +4 °С, морозильная камера с температурой -20 °С;
- рН-метр;
- вода дистиллированная по ГОСТ 7609-72;
- центрифуга лабораторная (4000 об/мин);
- плоскодонные планшеты;
- азид натрия;
- гидропирит, как источник 0,05 мМ перекиси водорода;
- тригидрат ацетата натрия;
- уксусная кислота ХЧ;
- 2,2'-azinoNs(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid).

Описание технологии метода:

1. Приготовление 0,1 М ацетатного буфера с рН 4,4.

Тригидрат ацетата натрия ($\text{C}_2\text{H}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$) в количестве 2,72 г растворить в 100 мл дистиллированной воды. Взять 37 мл готового раствора, добавить 63 мл 0,2 М уксусной кислоты и довести с помощью рН-метра (HANNA рН 213) до 4,4 (Досон Р. и др. Справочник биохимика, с. 357).

2. Приготовление раствора субстрата.

2,2'-azinoNs(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) в количестве 5,5 мг и 17 мг гидропирита растворить в 10 мл ацетатного буфера с рН 4,4. Растворить реактивы по отдельности и смешать перед использованием. Приготовленный раствор не хранить.

3. Приготовление стоп-раствора.

В 1 мл дистиллированной воды растворить 13 мг азидата натрия. После добавления в лунку планшеты всех реактивов концентрация азидата натрия составит 20 мМ.

4. Сбор ротовой жидкости.

Для исследования использовать ротовую жидкость, полученную натощак в утренние часы суток. Ротовую жидкость собирать в стерильные пробирки, которые маркируют и хранят при температуре -70 °С в морозильнике для хранения крови. Перед постановкой реакции размороженную ротовую жидкость центрифугировать в течение 10 минут.

5. Постановка реакции для определения миелопероксидазы в ротовой жидкости:

На каждую пробу в планшете отводится по 6 ячеек: 3 — контроль и 3 — опыт. Так как реакция протекает очень быстро и начинается сразу же при добавлении субстрата к слюне, то реакция останавливается азидом натрия. Дополнительно также нивелируется влияние ротовой жидкости на оптическую плотность. В контрольные три ячейки вносятся последовательно по 15 мкл ротовой жидкости, по 20 мкл азида натрия, по 150 мкл субстрата. В три опытных ячейки вносятся последовательно по 15 мкл ротовой жидкости, по 20 мкл дистиллированной воды и по 150 мкл субстрата. Планшет помещается в термостат при температуре 37 °С на 10 минут (время инкубации установлено опытным путем). Планшет помещается в многоканальный спектрофотометр Ф300, где при длине волны 405 нм (максимально близкая к оптимальному спектру поглощения 412 нм) определяется оптическая плотность.

6. Учет результатов реакции:

После десятиминутной инкубации при температуре 37 °С произвести количественный учет реакции на спектрофотометре при длине волны 405 нм.

Результат для каждой пробы ротовой жидкости вычисляется путем расчета разницы между средними показателями трех опытных и трех контрольных значений измерений. Пересчет активности в unit проводили по калибровочному графику (рис. 1) с коэффициентом корреляции 0,96 ($p < 0,001$), построенному по стандартной пероксидазе производства «Sigma».

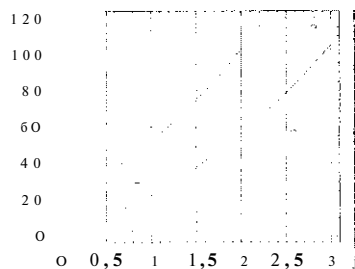


Рис. Калибровочный график для определения миелопероксидазной активности, выраженной в unit

Формула для пересчета:

$$\text{МПО} = (2,01 + 2,74 \times \text{ОП})^2,$$

где МПО — содержание миелопероксидазы в ротовой жидкости, ОП — оптическая плотность, определенная на спектрофотометре.

7. Определение шанса наличия у пациента флегмоны двух и более клетчаточных пространств с помощью компьютерных таблиц Excel по формуле

$$y = e^{0,107x - 1,76 / (1 + e^{0,107x - 1,76})},$$

где y — шанс наличия распространенной флегмоны; e — const = 2.72; x — значение МПО в ротовой жидкости в день госпитализации пациента в стационар.

Шкала вероятности распространения флегмон на два и более клетчаточных пространства.

Вероятность, %	Степень риска
0-50	Очень низкая
50-65	Низкая
65-85	Средняя
85-100	Высокая

Время, затраченное на каждый этап методики (хронометрия)

Этап постановки реакции	Время
Приготовление ацетатного буфера	20 минут (1 раз в месяц)
Приготовление раствора субстрата	20 минут (при каждой постановке опыта)
Внесение в лунки планшета ротовой жидкости и реактивов (16 проб — 1 планшета)	20 минут (при каждой постановке опыта)
Учет результатов реакции (16 проб)	20 минут

Возможные осложнения и ошибки

При определении миелопероксидазы в ротовой жидкости возможны следующие ошибки:

- возникновение ошибки при раннем смешивании реактивов во время приготовления раствора субстрата, так как начинается изменение цвета хромогенного субстрата без действия миелопероксидазы;
- при неполном растворении реактивов произойдет изменение концентраций, что изменит конечный результат;
- хранение ротовой жидкости при температуре не соответствующей (-20 °С) более месяца, что ведет к снижению активности фермента;
- хранение ацетатного буфера не в холодильной камере при температуре +4 °С, что приведет к изменению параметров буферной системы.

Противопоказания к применению

Все компоненты необходимые для определения миелопероксидазы в ротовой жидкости являются малотоксичными. Противопоказаний к применению не имеется.

Подписано в печать 04.07.11. Формат 60x84/16. Бумага писчая «Кюм Люкс».
Печать офсетная. Гарнитура «Times».
Усл. нем. л. 0,46. Уч.-изд. л. 0,22. Тираж 30 экз. Заказ 478.

Издатель и полиграфическое исполнение:
учреждение образования «белорусский государственный медицинский университет».
ЛИ № 02330/0494330 от 16.03.2009.
ЛИ № 02330/0150484 от 25.02.2009.
Ул. Ленинградская. 6, 220006, Минск.