

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 вносится последовательно по 15 мкл ротовой жидкости, по 20 мкл азидата натрия, по 150 мкл субстрата. В три опытных ячейки вносится 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».

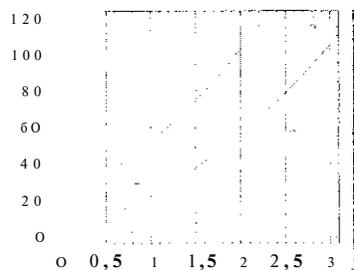


Рис. Калибровочный график для определения миелопероксидазной активности, выраженной в unit

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

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

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.