

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель Министра

Ю.Л.Горбич

2024 г.

Регистрационный № 024-0424



Метод выявления бактериальной инфекции мочевыводящих путей у  
пациентов с пересаженной почкой путем определения активности  
лизоцима в сыворотке крови человека  
инструкция по применению

**УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК:** учреждение образования «Витебский  
государственный ордена Дружбы народов медицинский университет»

**АВТОРЫ:** к.м.н., доцент В.Ю. Земко, к.м.н., доцент В.К. Окулич

Витебск, 2024

В настоящей инструкции по применению (далее – инструкция) изложен метод определения активности лизоцима сыворотки крови человека, который может быть использован для выявления бактериальной инфекции мочевыводящих путей у пациентов с пересаженной почкой.

Инструкция предназначена для врачей-нефрологов, врачей-трансплантологов, врачей-хирургов, врачей клинической лабораторной диагностики и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с пересаженной почкой в стационарных условиях.

### **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ МЕТОДА**

Пересаженная почка (Z94.0), первые 7 дней после пересадки почки, боль внизу живота, тазовой области или пояснице, повышение температуры тела, учащенное мочеиспускание с жжением в уретре, изменение цвета мочи с появлением гнойных выделений, лейкоцитоз в общем анализе крови.

### **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ МЕТОДА**

Отсутствуют.

### **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ, РЕАКТИВОВ, РАСХОДНЫХ МАТЕРИАЛОВ И ЛЕКАРСТВЕННЫХ СРЕДСТВ**

1. Весы лабораторные (наименьший предел взвешивания 10 мг, дискретность 1 мг).

2. Колбы стеклянные с градуированной горловиной и вместимостью 200-500 мл по ГОСТ 12738 – 77.

3. Автоматические регулируемые пипеточные дозаторы со стерильными наконечниками вместимостью 100-1000 мкл, 20-200 мкл.
4. Мерный цилиндр вместимостью 200-250 мл, 1 класса точности с ценой деления 1 мл по ГОСТ 1770 – 74.
5. Сухожаровой шкаф, поддерживающий температуру 56 °С.
6. Термостат электрический с автоматическим терморегулятором и ценой деления 1 °С, поддерживающий температуру 37 °С.
7. Флаконы стеклянные вместимостью 10 мл по ГОСТ 34038 – 2016.
8. Многоканальный фотометр, позволяющий регистрировать поглощение при длине волны 495 нм.
9. Холодильная камера, поддерживающая температуру 4 °С, морозильная камера, поддерживающая температуру минус 20 °С.
10. РН-метр лабораторный.
11. Плоскодонный полистироловый планшет с объемом лунки 300 мкл.
12. Вода дистиллированная по ГОСТ 6709 – 72.
13. Центрифуга лабораторная с центробежным ускорением 1300 g.
14. Мини-центрифуга лабораторная с центробежным ускорением 5300 g.
15. Одноразовая пластиковая посуда (стерильные пробирки типа «Эппендорф» объемом 1,0 мл).
16. 0,9% раствор NaCl.
17. Субстрат пептидогликана, меченый 2% Конго красным.
18. Калий фосфорнокислый однозамещенный ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) по ГОСТ 4198-75.
19. Натрий фосфорнокислый 2-замещенный 2-водный ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) по ГОСТ 4172-76.

## ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ПРИМЕНЕНИЯ МЕТОДА

1. Взятие крови и подготовка образцов к проведению реакции.

1.1 Кровь получают натощак с 8 до 9 часов утра из локтевой вены, центрифугируют с центробежным ускорением 1300 g в течение 10 минут для получения сыворотки крови человека.

1.2 Полученную сыворотку крови человека после центрифугирования используют для последующего определения активности лизоцима либо хранят в стерильных пробирках типа «Эппендорф» объемом 1,0 мл в морозильной камере при температуре минус 20 °С до 6 месяцев.

2. Приготовление 0,06 М фосфатного буферного раствора, рН 6,0 для последующего определения активности лизоцима.

2.1 1,59 г  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  растворить в 175,8 мл дистиллированной воды, добавить 0,29 г  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ , растворенного в 24,2 мл дистиллированной воды. Полученный раствор можно хранить в холодильной камере при температуре 4 °С.

3. Определение активности лизоцима в сыворотке крови человека.

3.1 Провести инактивацию комплемента в сыворотках крови человека путем нагревания в течение 1 часа при температуре 56 °С.

3.2 В две пробирки типа «Эппендорф» внести по 100 мкл сыворотки крови человека, по 300 мкл 0,06 М фосфатного буферного раствора, рН 6,0. В одну из пробирок внести 100 мкл субстрата пептидогликана, меченого 2% Конго красным. Во вторую пробирку (контрольную) внести 100 мкл 0,9% раствора NaCl.

3.3 Инкубировать в термостате при температуре 37 °С в течение 24 часов.

3.4 Пробы извлечь из термостата и центрифугировать с центробежным ускорением 5300 g в течение 10 минут.

3.5 Супернатант из опытной и контрольной пробирок поместить в лунки плоскодонного полистиролового планшета по 150 мкл в каждую.

3.6 Учет результатов проводить на многоканальном фотометре при длине волны 492 нм. Для оценки активности лизоцима сыворотки крови человека необходимо вычесть среднее значение оптической плотности для контрольной пробы из среднего значения оптической плотности для опытной пробы. Расчет активности лизоцима проводится по формуле:

$$X = 7318,72 \times (E_o - E_k)^{2,26},$$

где X – активность лизоцима в мкг/мл,

$E_o$  – значение оптической плотности в опытной пробе,

$E_k$  – значение оптической плотности в контрольной пробе.

4. Интерпретация полученных результатов.

Выявление значения активности лизоцима  $>321,4$  мкг/мл свидетельствует о бактериальной инфекции мочевыводящих путей у пациентов с пересаженной почкой с диагностической чувствительностью 85,7% и специфичностью 88,6%.

#### **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ**

При неполном растворении реактивов произойдет изменение концентрации растворов, что может повлиять на конечный результат.