

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра здравоохранения



Л.А. Постолякo

17 мая 2002 г.

Регистрационный № 6-0101

**Определение БАПНА-амидазной активности микроорганизмов,  
сывороток крови и иммуноглобулинов класса G**

(инструкция по применению)

**Учреждение-разработчик:** Витебский государственный медицинский университет

**Авторы:** доц. В.К. Окулич, проф. А.Н. Косинец, С.А. Сенькович, Е.А. Конопелько

**[Перейти к оглавлению](#)**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

Область применения .....	3
Перечень необходимого медицинского оборудования, реактивов, инструментария.....	4
Технология использования метода.....	5
Возможные осложнения и ошибки .....	7
Противопоказания к применению .....	8

Натрий-бензоил-DL-аргинин-4(р)-нитроанилида гидрохлорид (БАПНА) — хромогенный субстрат для определения протеолитической (трипсиноподобной) активности. Под действием фермента в щелочной среде происходит расщепление хромогенного субстрата с выделением 4-нитроанилина, окрашивающего раствор в желтый цвет.

## ОБЛАСТЬ ПРИМЕНЕНИЯ

*1. Микробиология.* Определение БАПНА-амидазной активности микроорганизмов позволяет качественно и количественно определить специфическую протеолитическую активность у бактерий. Так как БАПНА-амидазная активность выявляется только у грамотрицательных микроорганизмов (энтеробактерий и псевдомонад), ее определение может в определенной мере заменить окраску по Граму и служить критерием чистоты бактериальной культуры (исключить загрязнение чистой культуры стафилококков грамотрицательными бактериями). Более полные данные о трипсиноподобной активности микроорганизмов, полученные при использовании предлагаемой методики, позволят уточнить ее возможность для идентификации бактерий. В качественной модификации метод доступен для всех бактериологических лабораторий. Количественное определение рекомендуется для крупных научно-практических лабораторий изучающих факторы агрессии и инвазии у микроорганизмов.

*2. Клиническая лабораторная диагностика.* Определение сывороточной БАПНА-амидазной активности используется давно и широко в основном для диагностики заболеваний поджелудочной железы наряду с определением амилазной активности. Однако предложенный метод более прост в использовании и намного дешевле, так как является микрометодом, что расширяет возможности его использования и при других хирургических инфекциях. Определение БАПНА-амидазной активности сывороток доступно для всех клинических (биохимических) лабораторий.

*3. Иммунология.* Определение БАПНА-амидазной активности IgG, требует больших усилий, которые связаны с очисткой препаратов иммуноглобулинов. Вместе с тем определение активности IgG при хирургической инфекции более информативно, чем аналогичная сывороточная активность. Рекомендуется для научных лабораторий, занятых данной проблемой.

## **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО МЕДИЦИНСКОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ИНСТРУМЕНТАРИЯ**

- Весы равноплечные ручные ВР-100 по ГОСТу 395–54;
- весы лабораторные по ГОСТу 19491–74;
- разновесы по ГОСТу 7328–65;
- колбы стеклянные с градуированной горловиной по ГОСТу 12738–77;
- пипетки вместимостью 0,2 мл (цена деления 0,001 мл) и 1 мл (цена деления 0,002 мл) или автоматические пипетки со стерильными пластиковыми наконечниками в тех же объемах;
- пробирки стеклянные по ГОСТу 10515–75;
- спектрофотометр (возможно использование стандарта оптической плотности, денситометра или фотоэлектрокалориметра);
- анализатор иммуноферментный (мультискан);
- термостат электрический для выращивания бактерий с автоматическим терморегулятором и ценой деления 0,1° С;
- холодильник с температурой 4° С;
- рН-метр;
- вода дистиллированная по ГОСТу 7609–72;
- раствор хлорида натрия 0,9%;
- трис-(гидроксиметил)-аминометан (M121,14); трис-(оксиметил)-аминометан фосфат ( $C_4H_{11}N_0_2HPO_4$ ; M219,13); трис-(гидроксиметил)-аминометан фосфат или готовый коммерческий трис-буфер с рН 7,4;
- натрий-бензоил-DL-аргинин-4-нитроанилида гидрохлорид (БАПНА) с чистотой не ниже 98%;
- 4-нитроанилин;
- гидроксид натрия [NaOH];
- соляная кислота [HCl];
- диметилсульфоксид (димексид)  $[(CH_3)_2SO]$ ;
- центрифуга лабораторная (4 000 об./мин);
- плоскодонные планшеты для иммуноферментного анализа или культуральных исследований (возможно использование круглодонных планшет для иммунологических реакций).

## ТЕХНОЛОГИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА

### 1. Приготовление 0,02 моль трис-буфера с рН 7,4

Возможно использование готового коммерческого буфера или приготовленного по приведенным прописям:

- растворить 9,26 г трис-(гидроксиметил)-аминометана (M121,14) в 1 000 мл дистиллированной воды. Взять 25 мл готового раствора и добавить 42,5 0,1 N HCl, довести до 100 мл водой и проверить рН с помощью рН-метра;
- растворить 1,01 г трис-(оксиметил)-аминометан фосфата в 200 мл дистиллированной воды и довести 1 N NaOH до рН 7,4.

Учитывая большое разнообразие прописей для приготовления трис-буфера следует подбирать методику в зависимости от доступного соединения триса.

### 2. Приготовление раствора БАПНА

Растворить 24 мг БАПНА в 0,9 мл диметилсульфоксида в течение 10–15 мин при комнатной температуре и довести трис-буфером рН 7,4 до 30 мл. В случае плохого растворения БАПНА смесь выдержать 24 ч при температуре 4° С и центрифугировать в течение 20 мин при скорости 4 000 об./мин. Приготовленный раствор рекомендуется хранить при температуре 4° С не более 48 ч.

Растворы 4-нитроанилина готовят из 1% при необходимости положительного контроля добавляя необходимое количество дистиллированной воды: 100 мг развести в 1 мл диметилсульфоксида в течение 10–15 мин при комнатной температуре и довести этиловым 96% спиртом до 10 мл.

### 3. Постановка реакции для определения БАПНА-амидазной активности

3.1. *Микроорганизмы.* Для исследований рекомендуется использовать суточную чистую культуру стафилококков, энтеробактерий и псевдомонад, выращенных на мясопептонном агаре (для других микроорганизмов время инкубации и среду для культивирования следует подбирать учитывая их специфические потребности). Приготовить взвесь  $10^9$  микроорганизмов на 1 мл (оптическая плотность 0,83 единиц экстинции при длине волны 550 нм при измерении на спектрофотометре или 3,3 ЕД McFarland при измерении на денситометре, что соответствует 10 ЕД стандарта ГИСК им. Л.А. Тарасевича) на физиологическом растворе. Внести в лунку планшета 0,1 мл исследуемой взвеси бактерий и добавить 0,1 мл раствора БАПНА. Отрицательный контроль: 0,1 мл физиологического раствора и 0,1 мл раствора БАПНА. Положительный контроль: стандартный штамм микроорганизма с заведомо положительной активностью, например *P. aeruginosa* ATCC 27853 или 0,01% раствор 4-нитроанилина.

3.2. *Сыворотки.* В лунки планшета внести по 0,2 мл раствора БАПНА и по 0,005 мл исследуемой сыворотки. Контроль: 0,005 мл физиологического раствора и 0,2 мл раствора БАПНА.

3.3. *IgG.* В лунки планшета внести 0,1 мл раствора IgG на физиологическом растворе в концентрации 1,5 мг/мл и 0,1 мл раствора БАПНА. Контроль: 0,1 мл физиологического раствора и 0,1 мл раствора БАПНА.

### 4. Учет результатов реакции

После двадцатичасовой инкубации при температуре  $37,6^{\circ}\text{C}$  произвести количественный учет реакции на анализаторе иммуноферментном или спектрофотометре при длине волны 405 нм (при использовании спектрофотометра содержимое лунок развести в 20 раз).

С целью увеличения точности метода (для исключения вариаций оптической плотности лунок планшет) рекомендуется предварительное (до инкубации) измерение планшеты на иммуноферментном анализаторе при длине волны 405 нм. Тогда результат вычисляется по формуле:

$$X = E_{02} - E_{01} - E_k,$$

где  $E_{01}$  — оптическая плотность до инкубации,  $E_{02}$  — измерение пробы после инкубации,  $E_k$  — оптическая плотность контроля при длине волны 405 нм.

Далее результат (в пикокаталах) пересчитывается по следующим формулам.

Для мультискана:  $Y = 0,008 + 11 \times X$ , где  $Y$  — искомый результат БАПНА-амидазной активности в пикокаталах;  $X$  — оптическая плотность пробы минус оптическая плотность контроля.

Определение БАПНА-амидазной активности микроорганизмов, сывороток крови и иммуноглобулинов ...

Для спектрофотометра:  $Y = 20(-0,071 + 4,8 \times X)$ , где  $Y$  — искомый результат активности в пикокаталах;  $X$  — оптическая плотность пробы минус оптическая плотность контроля.

При качественном учете результаты оцениваются визуально по сравнению с контролем по следующей схеме: +++ — ярко-желтое окрашивание; ++ — желтое окрашивание; + — светло-желтое окрашивание; — — не отличается от отрицательного контроля. Использование шкалы растворов 4-нитроанилина поможет уточнить визуальный учет (см. табл.).

### Шкала растворов 4-нитроанилина

Раствор 4-нитроанилина	до 0,032%	до 0,008%	до 0,002%	до 0,0005%	менее 0,0005%
Окрашивание					
Визуальная оценка	++++	+++	++	+	—

## ВОЗМОЖНЫЕ ОСЛОЖНЕНИЯ И ОШИБКИ

При определении БАПНА-амидазной активности возможны следующие ошибки:

- при приготовлении раствора БАПНА, после добавления диметилсульфоксида, обязательна инкубация более 15 мин для полного растворения препарата;
- при превышении сроков хранения раствора БАПНА более 48 ч, возможны ложноотрицательные результаты;
- использование хилезной сыворотки или сыворотки, полученной из гемолизированной крови приводит к искажению результатов при определении сывороточной БАПНА-амидазной активности;
- определение БАПНА-амидазной активности микроорганизмов следует проводить только у чистых культур бактерий, так как примесь других микроорганизмов может исказить результат.

*Определение БАПНА-амидазной активности микроорганизмов, сывороток крови и иммуноглобулинов ...*

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Все компоненты необходимые для определения БАПНА-амидазной активности являются малотоксичными. Противопоказаний к применению не имеется.