

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ



Первый заместитель Министра

Д.Л. Пиневиц

«06» марта 2019 г.

Регистрационный № 002-0119

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ  
ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗ СЫВОРОТКИ КРОВИ**

(инструкция по применению)

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Витебский государственный  
ордена Дружбы народов медицинский университет»

АВТОРЫ: д.м.н., профессор Г.И. Юпатов, к.м.н., доцент В.К. Окулич,  
к.м.н., доцент С.А. Сенькович, В.А. Прищепенко

Витебск, 2019

В настоящей инструкции по применению (далее инструкция) представлен метод определения активности дезоксирибонуклеаз сыворотки крови, который может быть использован в комплексе медицинских услуг, направленных на дифференциальную диагностику хронического гепатита, цирроза и фиброза печени.

Инструкция предназначена для врачей лабораторной-диагностики, врачей-гастроэнтерологов, врачей-терапевтов и иных врачей-специалистов организаций здравоохранения, оказывающих медицинскую помощь пациентам с болезнями печени в стационарных и (или) амбулаторных условиях. Область применения: лабораторная диагностика, гастроэнтерология, гепатология.

### **ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМЫХ МЕДИЦИНСКИХ ИЗДЕЛИЙ**

- одноразовые системы взятия крови (типа шприц-пробирка, обеспечивающая как поршневой способ забора крови, так и вакуумный и вакуумные системы, обеспечивающие сбор крови вакуумным методом; при их отсутствии в случае необходимости - стерильные одноразовые шприцы: 10 мл, 20 мл);
- вата медицинская;
- стерильные пробирки объемом 15 мл с крышками;
- весы лабораторные по ГОСТ 19491–74;
- разновесы по ГОСТ 7328–65;
- колбы стеклянные с градуированной горловиной по ГОСТ 12738–77;
- многоканальный спектрофотометр со светофильтром 450 нм;
- термостат электрический суховоздушный с автоматическим терморегулятором и ценой целения 0,1 °С;
- холодильная камера с температурой +4 °С, морозильная камера с температурой (-20) °С;

- центрифуга лабораторная клиническая;
- автоматические регулируемые пипетки со стерильными наконечниками вместимостью 100-1000 мкл, 20-200 мкл;
- рН-метр;
- пробирки стеклянные по ГОСТ 10515–75;
- 96-луночный плоскодонный полистироловый планшет;
- пробирки пластиковые типа «Эппендорф» по 1,5 мл;
- вода дистиллированная по ГОСТ 7609 – 72;
- дезоксирибонуклеиновая кислота;
- трис-(гидроксиметил)-аминометан;
- 0,1 N хлористоводородная кислота;
- семиводный магния сульфат;
- раствор этидия бромида (1 г/л);
- дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК): сухое вещество.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

Метод применим при выявлении цитолитического синдрома у пациентов с хроническими диффузными заболеваниями печени при отсутствии признаков декомпенсации и сомнения в наличии цирроза печени (для лабораторной дифференциальной диагностики хронического гепатита и цирроза печени), при исключенной вирусной этиологии заболевания.

## **ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ**

Отсутствуют. За исключением случаев, при которых невозможно получить периферическую венозную кровь или имеются противопоказания для венепункции.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

### **1.Сбор биологического материала.**

В качестве биологического материала используют сыворотку крови. Для получения сыворотки крови в стерильные маркированные пробирки с крышками (красного, желтого, оранжевого цвета) собирают периферическую венозную кровь пациента натошак в условиях процедурного кабинета или лаборатории. Кровь в закрытых пробирках выдерживают при комнатной температуре от 30 до 60 минут до образования сгустка. Кровь центрифугируют в течение 10 мин с угловой скоростью вращения ротора 10000 оборотов в мин при комнатной температуре. С помощью автоматической пипетки со стерильными наконечниками, не касаясь слоя форменных элементов, переносят надосадочную жидкость (сыворотку крови) в маркированные пробирки типа «Эппендорф». Для исследования используют сыворотку крови сразу после получения или замораживают и хранят при температуре не выше минус 20 °С не более 1 месяца.

### **2.Приготовление 0,02 моль/л трис-НСl буфера с рН 7,4, содержащего магния-сульфат в концентрации 4 ммоль/л.**

0,2315 г трис-(гидроксиметил)-аминометана растворяют в 25 мл дистиллированной воды и добавляют 42,5 мл 0,1 N хлористоводородной кислоты (НСl). Полученный раствор доводят дистиллированной водой до 100 мл. Проверяют рН раствора с помощью рН-метра, при необходимости доводят до рН 7,4. К 100 мл полученного раствора добавляют 0,0984 г семиводного магния сульфата ( $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ ). Буферный раствор хранят плотно закрытым крышкой в холодильнике при температуре +4 °С не более 1 месяца.

### **1. Приготовление рабочего раствора субстрата.**

В буферный раствор вносят дезоксирибонуклеиновую кислоту в количестве, требуемом для достижения ее конечной концентрации 1 г/л (1 мг/мл). Для полного растворения рабочий раствор ДНК перемешивают, и выдерживают в течение 24 ч при температуре +4 °С. Рабочий раствор используют в течении суток после приготовления.

### **2. Постановка реакции определения активности дезоксирибонуклеаз сыворотки крови.**

Постановку реакции осуществляют в лунках полистиролового планшета в дублях. В опытную пробу добавляют 180 мкл рабочего раствора ДНК и 50 мкл сыворотки крови. В контрольную пробу добавляют 180 мкл буферного раствора и 50 мкл сыворотки крови. Планшет помещают в термостат и инкубируют в течение 24 ч при 37 °С. После инкубации к опытным и контрольным пробам добавляют по 50 мкл 0,1 % раствора этидия бромида. Проводят дополнительную 30 минутную инкубацию в термостате при 37 °С, в течение которой происходит связывание этидия бромида с неразрушенной ДНК. Далее планшет помещают в многоканальный спектрофотометр и измеряют оптическую плотность проб при длине волны 450 нм.

### **3. Учет результатов реакции.**

Оптическую плотность пробы ( $A_{пр}$ ) вычисляют как разницу между оптической плотностью контрольной пробы ( $A_{к}$ ), и опытной пробы ( $A_{оп}$ ). Для расчета активности дезоксирибонуклеаз сыворотки крови используют формулу:

$$X = (12,899 - 28,9743 \cdot A_{пр})^2$$

$$A_{пр} = A_{к} - A_{оп}$$

где  $X$  – активность дезоксирибонуклеаз сыворотки крови, U/ml;

$A_{пр}$  – разница оптической плотности контрольной и опытной проб;

Ак – оптическая плотность контрольной пробы;

Аоп - оптическая плотность опытной пробы;

12,899 и 28,9743 – используемые для расчета активности ДНК-аз постоянные величины.

При значении  $A_{пр} \geq 0,435$  устанавливают нулевое значение дезоксирибонуклеазной активности в исследуемой сыворотке крови.

При выявлении цитолитического синдрома у пациентов с хроническими диффузными заболеваниями печени и проведении дифференциальной диагностики между хроническим гепатитом (независимо от степени активности) и циррозом печени (класс тяжести А, В, С по Чайлд-Пью) при отсекающем значении уровня активности дезоксирибонуклеаз  $>0,194$  U/мл с чувствительностью 72,73% [ДИ95%=54,5÷86,7] и специфичностью 77,78% [ДИ95%=66,4÷86,7]; (+)LR=3,27; (-) LR=0,35; (+)PV=60,0 [ДИ95%=48,1÷70,8]; (-)PV=86,2 [ДИ95%=77,9÷91,7] можно сделать заключение в пользу хронического гепатита (AUC=0,770 [ДИ95%=0,677÷0,846],  $p < 0,001$ , J-индекс = 0,5051). Шанс выявить повышение уровня активности дезоксирибонуклеаз выше 0,194 U/мл у пациентов с хроническим гепатитом составляет 2,667; у пациентов с циррозом печени – 0,262; отношение шансов (OR) – 10,167 [ДИ95%=3,958÷26,115]. Отношение шансов при отсутствии хронического гепатита и повышении уровня активности дезоксирибонуклеаз – 0,098.

Для повышения специфичности, отношения правдоподобия (+LR) и отношения шансов (OR) метода, принято отсекающее значение  $>11,93$  U/мл. При значении уровня активности дезоксирибонуклеаз  $>11,93$  U/мл с чувствительностью 54,55% [36,4÷71,9] и специфичностью 90,28% [ДИ95%=81,0÷96,0]; (+)LR=5,61; (-)LR=0,50; (+)PV=72,0 [ДИ95%=54,4÷84,7]; (-)PV=81,2 [ДИ95%=74,7÷86,4] можно сделать заключение в пользу хронического гепатита (AUC=0,770

[ДИ95%=0,677÷0,846],  $p < 0,001$ , J-индекс = 0,5051). Шанс выявить повышение уровня активности дезоксирибонуклеаз выше 11,93 U/мл у пациентов с хроническим гепатитом составляет 1,2; у пациентов с циррозом печени – 0,1; отношение шансов (OR) – 12,0 [ДИ95%=4,259÷33,814]. Отношение шансов при отсутствии хронического гепатита и повышении уровня активности дезоксирибонуклеаз – 0,083. Таким образом, при уровне активности дезоксирибонуклеаз выше 11,93 U/мл снижается вероятность диагностической ошибки (постановки ложноположительного заключения: цирроз печени).

### **ВРЕМЯ, ЗАТРАЧЕННОЕ НА КАЖДЫЙ ЭТАП МЕТОДА (ХРОНОМЕТРИЯ)**

<b>Этап постановки реакции</b>	<b>Время</b>
Приготовление буферного раствора 0,02 моль/л трис-HCl pH 7,4 с добавлением 4 ммоль/л MgSO <sub>4</sub>	40 минут (1 раз в месяц)
Приготовление раствора ДНК	24 часа (1 раз в неделю)
Постановка реакции (48 проб)	30 минут (при каждой постановке)
Инкубация проб	24 часа + 30 мин (при каждой постановке)
Учет результатов реакции (48 проб)	10 минут (при каждой постановке)
Клиническая интерпретация полученных данных	10 минут

## **ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ**

1. Нарушение условий получения и хранения биологических материалов может исказить результат реакции.

2. Нарушение условий хранения реактивов, использование реактивов с истекшим сроком годности не может гарантировать достоверных результатов.

3. Неполное растворение реактивов (наличие осадка, нитей, хлопьев при визуальном исследовании) приведет к изменению их концентрации, что может повлиять на конечный результат.

4. Хранение буферного раствора при температуре выше 4 °С, может привести к изменению параметров буферной системы и активности ферментов дезоксирибонуклеаз.

### **ОГРАНИЧЕНИЯ МЕТОДА**

Данный метод не является основным при постановке диагноза, а используется как дополнительный при затруднительных случаях дифференциальной диагностики между хроническим гепатитом и циррозом печени.

Определение активности дезоксирибонуклеаз сыворотки крови не позволяет производить дифференциальную диагностику по этиологии заболевания и, таким образом, не дает возможности отличить алкогольный (K70.1) от неуточненного (K73) гепатита, а также установить этиологию цирроза печени. Для достоверной оценки полученных результатов необходимо исключить вирусную этиологию заболевания.

Уровень активности дезоксирибонуклеаз сыворотки крови не зависит от степени активности хронического гепатита и класса тяжести цирроза печени.



При отсекающем значении уровня активности дезоксирибонуклеаз  $>0,194$  У/мл снижается уровень специфичности и отношения правдоподобия, и при этом повышается чувствительность метода. При отсекающем значении  $>11,93$  У/мл повышается специфичность и отношение правдоподобия, однако снижается чувствительность метода.

При работе с биологическими жидкостями и этидия бромидом необходимо использовать средства индивидуальной защиты органов дыхания и глаз, лабораторный халат, головной убор, одноразовые нестерильные перчатки, нарукавники, непромокаемый фартук. При работе должны соблюдаться требования Санитарных правил и норм 2.1.12-18-2006 «Устройство, оборудование и содержание экспериментально-биологических клиник (вивариев)», утвержденных Постановлением Главного государственного санитарного врача Республики Беларусь от 31 октября 2016г. № 131, «Правил по охране труда в организациях здравоохранения», утвержденных Постановлением Министерства труда и социальной защиты Республики Беларусь от 10.06.2009 №64, других НПА, ТНПА.

Этидия бромид — канцерогенное соединение, связывающее ДНК и вызывающее мутации в ней. Необходимо соблюдать меры безопасности: 1) использовать средства индивидуальной защиты органов дыхания и глаз, лабораторный халат, головной убор, одноразовые нестерильные перчатки, нарукавники, непромокаемый фартук; 2) при попадании на кожу или слизистые оболочки тщательно промыть соответствующий участок проточной водой в течении 10 минут.