

МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ

УТВЕРЖДАЮ



Первый заместитель Министра  
\_\_\_\_\_ Д.Л. Пиневич

«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

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

\_\_\_\_\_ Д. Л. Пиневиц  
06.03.2019

Регистрационный № 002-0119

**МЕТОД ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗ  
СЫВОРОТКИ КРОВИ**

инструкция по применению

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

АВТОРЫ: д-р. мед. наук, проф. Г. И. Юпатов, канд. мед. наук, доц. В. К. Окулич,  
канд. мед. наук, доц. 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 НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, СРЕДСТВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ**

1. 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, 20 мл);

2. вата медицинская.

3. Стерильные пробирки объемом 15 мл с крышками.

4. Весы лабораторные по ГОСТ 19491–74.

5. Разновесы по ГОСТ 7328–65.

6. Колбы стеклянные с градуированной горловиной по ГОСТ 12738–77.

7. Многоканальный спектрофотометр со светофильтром 450 нм.

8. Термостат электрический суховоздушный с автоматическим терморегулятором и ценой деления 0,1 °С.

9. Холодильная камера с температурой 4 °С, морозильная камера с температурой -20 °С.

10. Центрифуга лабораторная клиническая.

11. Автоматические регулируемые пипетки со стерильными наконечниками вместимостью 100–1000, 20–200 мкл.

12. рН-метр.

13. Пробирки стеклянные по ГОСТ 10515–75.

14. 96-луночный плоскодонный полистироловый планшет.

15. Пробирки пластиковые типа «Эппендорф» по 1,5 мл.

16. Вода дистиллированная по ГОСТ 7609–72.

17. Дезоксирибонуклеиновая кислота.

18. Трис-(гидроксиметил)-аминометан.

19. 0,1 N хлористоводородная кислота.

20. Семиводный магния сульфат.

21. Раствор этидия бромид (1 г/л).

22. Дезоксирибонуклеиновая кислота (ДНК): сухое вещество.

## **ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ**

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 венопункции.

## **ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ МЕТОДА**

### **Сбор биологического материала**

В качестве биологического материала используют сыворотку крови. Для ее получения в стерильные маркированные пробирки с крышками (красного, желтого, оранжевого цвета) собирают периферическую венозную кровь пациента натощак в условиях процедурного кабинета или лаборатории. Кровь в закрытых пробирках выдерживают при комнатной температуре от 30 до 60 мин до образования сгустка. Кровь центрифугируют в течение 10 мин с угловой скоростью вращения ротора 10000 об/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  $-20^{\circ}\text{C}$  не более 1 мес.

### **Приготовление 0,02 моль/л трис-НСI 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 (НСI). 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 ( $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ). Буферный раствор хранят плотно закрытым крышкой в холодильнике при температуре  $4^{\circ}\text{C}$  не более 1 мес.

### **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  $^{\circ}\text{C}$ . Рабочий раствор используют в течение 1 сут после приготовления.

### **Реакция 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 бромид. Производят дополнительную 30-минутную инкубацию в термостате при 37 °С, в течение которой происходит связывание этидия бромид с неразрушенной ДНК. Далее планшет помещают в многоканальный спектрофотометр и измеряют оптическую плотность проб при длине волны 450 нм.

#### **Учет результатов реакции**

Оптическую плотность пробы (Апр) вычисляют как разницу между оптической плотностью контрольной пробы (Ак) и опытной пробы (Аоп). Для расчета активности дезоксирибонуклеаз сыворотки крови используют формулу:

$$X = (12,899 - 28,9743 \cdot \text{Апр})^2$$
$$\text{Апр} = \text{Ак} - \text{Аоп}.$$

где X — активность дезоксирибонуклеаз сыворотки крови, U/ml;  
Апр — 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 уровне  $\text{Апр} \geq 0,435$  устанавливают нулевое значение дезоксирибонуклеазной активности в исследуемой сыворотке крови.

При выявлении цитолитического синдрома у пациентов с хроническими диффузными заболеваниями печени и дифференциальной диагностике 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 % [ДИ 95 % = 54,5÷86,7] и специфичностью 77,78 % [ДИ 95 % = 66,4÷86,7]; (+)LR = 3,27; (-)LR = 0,35; (+)PV = 60,0 [ДИ 95 % = 48,1÷70,8]; (-)PV = 86,2 [ДИ 95 % = 77,9÷91,7] можно сделать заключение в пользу хронического гепатита (AUC = 0,770 [ДИ 95 % = 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 с циррозом печени — 0,262; отношение шансов (OR) — 10,167 [ДИ 95 % = 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 уровне активности дезоксирибонуклеаз  $>11,93$  U/мл с чувствительностью 54,55 % [36,4÷71,9] и специфичностью 90,28 % [ДИ 95 % = 81,0÷96,0]; (+)LR = 5,61; (-)LR = 0,50; (+)PV = 72,0 [ДИ 95 % = 54,4÷84,7]; (-)PV = 81,2 [ДИ 95 % = 74,7÷86,4] можно сделать заключение в пользу хронического гепатита

(AUC = 0,770 [ДИ 95 % = 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; с циррозом печени — 0,1; отношение шансов (OR) — 12,0 [ДИ 95 % = 4,259÷33,814]. Отношение шансов при отсутствии хронического гепатита и повышении активности дезоксирибонуклеаз — 0,083. Таким образом, при уровне активности дезоксирибонуклеаз выше 11,93 U/мл снижается вероятность диагностической ошибки (ложноположительного заключения: цирроз печени).

Таблица — Время, затраченное на каждый этап метода (хронометрия)

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

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

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.

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

Определение активности дезоксирибонуклеаз сыворотки крови не позволяет проводить 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  $>0,194$  U/мл снижается уровень специфичности и отношения правдоподобия и при этом повышается чувствительность метода. При отсекающем значении  $>11,93$  U/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 №131 от 31.10.2016, «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 течение 10 мин.