

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°C не более 1 мес.

Приготовление 0,02 моль/л трис-HCl буфера с pH 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 (HCl). Полученный раствор доводят дистиллированной водой до 100 мл. Проверяют pH раствора с помощью pH-метра, при необходимости доводят до pH 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°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 ₄	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.