

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ

Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть

13 декабря 2007 г.

Регистрационный № 014-0407

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ ФЕРМЕНТАТИВНОЙ (ГИАЛУРОНИДАЗНОЙ
И ДЕЗОКСИРИБОНУКЛЕАЗНОЙ) АКТИВНОСТИ
ДЕПОЛИМЕРИЗУЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ ПРИ АУТОИММУННОЙ
И ИНФЕКЦИОННОЙ ПАТОЛОГИИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЕ-РАЗРАБОТЧИК: УО «Витебский государственный
медицинский университет»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. И.И. Генералов, д-р мед. наук, проф.
А.М. Литвяков, канд. мед. наук Е.В. Кундер, А.М. Моисеева

Витебск 2007

ПЕРЕЧЕНЬ НЕОБХОДИМОГО ОБОРУДОВАНИЯ, РЕАКТИВОВ, ПРЕПАРАТОВ, ИЗДЕЛИЙ МЕДИЦИНСКОЙ ТЕХНИКИ

Колбы стеклянные лабораторные.
Стаканы стеклянные лабораторные.
Пробирки центрифужные стеклянные.
Пробки конусные.
Весы равноплечие ручные.
Весы лабораторные.
Набор пипеток автоматических от 0,02 до 1,0 мл.
Магнитный смеситель с магнитом цилиндрическим ММЗ-94-5245.
Термостат электрический с автоматическим терморегулятором до температуры 50 °С с ценой деления 0,2 °С.
Центрифуга с угловым ротором ЦЛК-2.
Центрифуга с бакетным ротором ОПН-8.
Спектрофотометр СФ-26 или СФ-46.
Холодильник бытовой электрический с температурой в камере 4–6 °С.
Универсальная индикаторная бумага рН 1–12 или рН-метр.
Анализатор иммуноферментный АИФ.
Тюбинги диализные.
Бумажные фильтры.
Вода дистиллированная.
Агароза, конъюгированная с белком А золотистого стафилококка.
Трис-(гидроксиметил)-аминометан.
Этакридина лактат (риванол).
ДНК (высокополимерная из тимуса теленка).
Хлорид натрия «хч» или «чда».
Хлорид магния «хч» или «чда».
Гидрофосфат натрия двухводный «хч» или «чда».
Дигидрофосфат натрия двух- или двенадцативодный «хч» или «чда».
Тритон X-305 или Тритон X-100.
Глицин или кислота аминокусусная (натриевая соль).
Активированный уголь.
Аммония сульфат.
Соляная кислота (фиксанал).
Уксусная кислота (фиксанал).
Серная кислота концентрированная (фиксанал).
Натрия гидроксид (фиксанал).

ПОКАЗАНИЯ К ПРИМЕНЕНИЮ

Методика предназначена для микроопределения ферментативной активности деполимеризующего действия (гиалуронидазной и дезоксирибонуклеазной, ДНКазной) в сыворотках крови больных аутоиммунными заболеваниями (системной красной волчанкой, псориатическим артритом, ревматоидным артритом, анкилозирующим спондилитом), инфекционной патологией (хирургическими гнойно-

воспалительными заболеваниями и осложнениями, бактериальным эндокардитом, реактивными артритами, ассоциированными с урогенитальной инфекцией и др.), а также в препаратах иммуноглобулинов, обладающих абзимной активностью, и синовиальной жидкости лиц с заболеваниями суставов.

ПРОТИВОПОКАЗАНИЯ ДЛЯ ПРИМЕНЕНИЯ

Противопоказаний к применению не имеет.

ОПИСАНИЕ ТЕХНОЛОГИИ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ СПОСОБА

Приготовление буферных растворов

Для определения гиалуронидазной активности сывороток и синовиальной жидкости.

Приготовление 0,004 М ацетатного буфера, рН 3,8

Для приготовления 100 мл 0,1 М ацетатного буфера (рН 3,8) к 84,3 мл 1 н раствора уксусной кислоты добавляют 10 мл 1 н гидроксида натрия. Проверяют рН буфера и при необходимости подтитровывают раствор. Из полученного раствора готовят рабочий 0,004 М ацетатный буфер, содержащий 0,15 М раствор хлорида натрия.

Для определения ДНКазной активности сывороток, иммуноглобулинов и синовиальной жидкости.

Приготовление 0,05 М трис-НСl буфера рН 7,4 и 8,3

Готовят исходный 0,05 М трис-НСl буферный раствор. Для получения раствора с рН 8,3 к 50 мл 0,1 М раствора трис (трис-(гидрокси)-метиламинометан, 12,114 г/л) добавляют 14,7 мл 0,1 М НСl. Для получения раствора с рН 7,4 к 50 мл 0,1 М раствора трис добавляют 41,5 мл 0,1 М НСl. Растворы доводят до 100 мл дистиллированной водой. Проверяют рН буферов и при необходимости подтитровывают. Рабочий буфер получают, разбавляя исходный в 2,5 раза дистиллированной водой.

Для определения ДНКазной активности в буферные растворы вносят хлорид магния до конечной концентрации 0,01 М.

Приготовление 0,1 М фосфатного буфера, рН 7,4

Для приготовления буфера 2,884 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 70–80 мл дистиллированной воды. Далее 0,593 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 15–20 мл воды. Растворы объединяют. Проверяют рН и при необходимости подтитровывают буфер. Раствор разбавляют водой до 200 мл.

Приготовление 0,1 М фосфатного буфера рН 7,4 с 1% раствором детергента

Для приготовления буфера 1 г тритона X-305 (или тритона X-100) растворяют в 100 мл 0,1 М фосфатного буфера рН 7,4.

Приготовление 0,1 М глицин-НСl буфера, рН 2,8

Для приготовления буфера 1,14 г глицина растворить в 130 мл дистиллированной воды. Затем к полученному раствору добавить 48 мл

0,1М HCl. Контроль pH осуществляется на pH-метре. Раствор доводят до 200 мл дистиллированной водой.

Приготовление субстратных растворов и других реактивов

Приготовление субстрата гиалуроновой кислоты

Гиалуроновую кислоту (ГК) получают по методам, предложенным РНИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи. Для этого пупочные канатики новорожденных собирают в достаточном количестве. Пуповины разрезают и отмывают от крови дистиллированной водой. Извлекают сосуды. Взвешивают полученный материал. Далее препарат отмывают трехкратно большими объемами дистиллированной воды, обсушивают на фильтровальной бумаге и измельчают до кашицеобразного состояния. При повторном взвешивании его масса увеличивается приблизительно в 2 раза. Материал оставляется в течение ночи на холоде при 4 °С. После этого препарат нагревают до кипения и фильтруют через ватный фильтр. Препарат ГК разливают по флаконам и замораживают до постановки реакции. Перед постановкой его размораживают и осветляют центрифугированием при 6000 об/мин в течение 15 мин.

Стандартизацию препарата осуществляют по оптической плотности риванолового сгустка. Для этого к 0,2 мл приготовленного препарата гиалуроновой кислоты добавляют 0,1 мл 0,15 М раствора хлорида натрия, тщательно встряхивают, далее вносят 0,1 мл рабочего 0,004 М ацетатного буфера, pH 3,8, содержащего 0,15 М раствор хлорида натрия, и также тщательно встряхивают. Определение проводят в центрифужной пробирке. Далее на поверхность смеси наслаивают 0,02 мл 0,75% раствора риванола и встряхивают до получения сгустка. После этого пробу отмывают 5–8 мл дистиллированной воды, осажая сгусток в течение 2–3 мин при комнатной температуре. При необходимости сгусток центрифугируют при 1000 об/мин в течение 1 мин, надосадок сливают. Сгусток экстрагируют 0,5 мл смеси равных объемов 1 н HCl и концентрированной серной кислоты. Смесь следует готовить с соблюдением необходимых предосторожностей в термостойкой посуде в вытяжном шкафу в бане с водяным охлаждением при температуре 5–10 °С. Необходимо приливать малыми порциями серную кислоту к 1 н HCl с постоянным помешиванием, предупреждая нагревание.

Для экстракции риванола после добавления смеси пробы прогревают при $t = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 2–3 мин.

После экстракции хромогена 0,2 мл пробы вносят в стандартный планшет для ИФА и фотометрируют на мультискане АИФ М/340 (методика № 1, максимум поглощения светофильтра — 405 нм).

Для работы используют ГК при оптической плотности сгустка 0,85–1,05 при фотометрии. При необходимости препарат следует развести в соответствующее число раз дистиллированной водой.

При использовании стандартного коммерческого препарата ГК препарат тщательно растворяют в дистиллированной воде и также проверяют сгусток ГК риванолом.

Приготовление рабочего раствора ДНК

Готовят исходный 0,1% раствор ДНК (1 мг/мл), тщательно перемешивая необходимую навеску ДНК до полного растворения в дистиллированной воде. Рабочий раствор готовят из основного раствора непосредственно перед постановкой реакции. Его концентрация обычно составляет 0,25–0,35 мг ДНК/мл.

Перед постановкой методики проверяют состояние рабочего раствора ДНК. Для этого к 0,2 мл рабочего раствора ДНК добавляют 0,1 мл физиологического раствора и 0,1 мл 0,02 М трис-НСl буфера, рН 8,3, с 0,01 М хлоридом магния. Затем к пробе добавляют 0,02 мл 0,75% раствора риванола и встряхивают до образования сгустка ДНК. Он должен быть плотным и компактным. Его отмывают, экстрагируют при 100 °С 1 М раствором НСl в течение 1–2 мин и фотометрируют, как описано выше. Для работы используют сгусток ДНК при оптической плотности сгустка 0,9–1,2 при фотометрии.

В случае необходимости (при образовании рыхлого мелкого сгустка с низкой оптической плотностью) концентрацию раствора ДНК увеличивают и процедуру проверки повторяют.

Приготовление 0,75% раствора этакридина лактата (риванола)

75 мг риванола растворяют в 2–3 мл дистиллированной воды и доводят общий объем до 10 мл дистиллированной водой.

Приготовление рабочих разведений сывороток, препаратов иммуноглобулинов, синовиальной жидкости для постановки гиалуронидазной и ДНКазной реакции

Получение сывороток крови больных и здоровых лиц (доноров крови)

Негепаринизированную человеческую кровь в количестве 5–10 инкубируют в течение 2 ч при температуре 4 °С до образования сгустка. Затем центрифугируют 10–15 мин в центрифужных пробирках в центрифуге с бакетным ротором (1500 об/мин). Аккуратно забирают чистую сыворотку.

Для постановки ДНКазной реакции сыворотку разводят изотоническим раствором хлорида натрия. Рабочие разведения сыворотки — 1/5, 1/10 и 1/20.

Для постановки гиалуронидазной реакции сыворотку разводят изотоническим раствором хлорида натрия. Рабочие разведения сыворотки — 1/100, 1/200 и 1/500.

Выделение IgG из сыворотки крови больных аутоиммунными заболеваниями, а также здоровых лиц (доноров крови)

Приготовление оборудования для выделения сывороточных иммуноглобулинов. Набивка колонки, содержащей активированный уголь

Мелкодисперсный уголь объемом 3 мл аккуратно вводят в колонку, периодически потряхивая ее для лучшего заполнения. Уравновешивают 0,01 М фосфатным буфером, рН 7,4, который пропускают через колонку.

Набивка колонки для аффинной хроматографии, содержащей агарозу, конъюгированную с протеином А золотистого стафилококка

Агарозу, конъюгированную с протеином А золотистого стафилококка, аккуратно настилают на бумажный фильтр и заполняют колонку до 3–4 мл объема гранул агарозы. Промывают колонку 0,01 М буфером, pH 7,4, и уравнивают 0,1 М буфером, pH 7,4. Для хранения колонок для аффинной хроматографии добавляют 0,5 мл 1% раствора азиды Na на 5 мл объема колонки (для приготовления 1% раствора 0,1 г азиды Na доводят до 10 мл дистиллированной водой) и хранят в холодильнике при температуре 4 °С.

Выделение сывороточных иммуноглобулинов G

К сыворотке крови прибавляют охлажденный до 4 °С 0,75% раствор риванола в соотношении 1 объем риванола к 2 объемам сыворотки. Смесь инкубируют при температуре 4 °С не менее 2 ч. Осадок отбрасывают, надосадочную жидкость пропускают через колонку, заполненную активированным углем. Полученный после этого препарат подвергают аффинной хроматографии, пропуская препарат через колонку с агарозой, конъюгированной с протеином А золотистого стафилококка, уравновешенную 0,1 М фосфатным буфером со скоростью 6–7 капель в мин. После этого колонку последовательно промывают 0,1 М фосфатным буфером, pH 7,4, без детергента, затем с 1% раствором тритона X-305 и далее отмывают буфером без детергента до исчезновения белка в элюенте. Элюцию связавшихся иммуноглобулинов класса G (G1, G2, G4) ведут 0,1 М глицин-HCl буфером, pH 2,8, до исчезновения белка в пробе (отбирают отдельно фракции по 1–1,5 мл). Фракции, содержащие наиболее высокие концентрации белка, объединяют. Их немедленно нейтрализуют 1 М раствором Трис. Колонку после элюции промывают 0,1 М фосфатным буфером с 1% раствором тритона X-305, pH 7,4, и затем 0,02 М фосфатным буфером без детергента с pH 7,4. Препарат трехкратно диализуют против изотонического раствора хлорида натрия. Полученный препарат после диализа осветляют, центрифугируя в центрифуге с бакетным ротором при 1500 об/мин в течение 10 мин. Концентрацию белка в препарате определяют спектрофотометрически на длине волны 280 нм. Хранят препараты иммуноглобулинов в пластиковых пробирках в морозильнике при –20 °С.

Получение синовиальной жидкости

В асептических условиях производят артроцентез коленных суставов и забирают синовиальную жидкость. Затем ее центрифугируют 10 мин в пробирках в центрифуге с бакетным ротором (1500 об/мин). Аккуратно забирают надосадок и используют для реакций. Предварительно синовиальную жидкость разводят 1/10 0,15 М раствором NaCl. Для постановки ДНКазной реакции используют разведения 1/10 и 1/20 на физиологическом растворе, для постановки гиалуронидазной реакции готовят разведения 1/200 и 1/500 на 0,02 М ацетатном буфере, pH 3,8, содержащем 0,15 М раствор хлорида натрия.

Постановка методов определения ферментативной активности

Определение гиалуронидазной активности сывороток и синовиальной жидкости

Метод определения основан на образовании сгустка риванола с гиалуроновой кислотой обратно пропорционально деполимеризации последней под действием гиалуронидазной активности различного происхождения.

Реакцию осуществляют следующим образом: к 0,2 мл раствора стандартизованного препарата гиалуроновой кислоты добавляют 0,1 мл сыворотки, разведенной 1/100, 1/200 и 1/500 физиологическим раствором (или синовиальной жидкости, разведенной 1/200 и 1/500), тщательно встряхивают, далее вносят 0,1 мл рабочего 0,004 М, рН 3,8, ацетатного буфера, содержащего 0,15 М раствор хлорида натрия, и также тщательно встряхивают. В контроле вместо сыворотки или синовиальной жидкости используют 0,15 М раствор хлорида натрия. Постановка реакции осуществляется в центрифужных пробирках в дублях. После инкубации в течение 1 ч при 37 °С на поверхность проб наслаивают 20 мкл 0,75% раствора риванола, встряхивают до получения сгустка. В случае высокой активности сгусток в первом разведении не образуется.

Далее оценивают реакцию. При визуальном учете реакцию сгусткообразования оценивают в баллах. Отсутствие активности — компактный сгусток — 0 баллов; минимальная активность — рыхлый сгусток — 1 балл; слабая активность — рыхлый сгусток, хлопья, нити — 2 балла; умеренная активность — хлопья, нити — 3 балла; высокая активность — распад сгустка, хлопья, нити — 4 балла; максимальная активность — полный распад сгустка ГК с образованием гомогенной взвеси — 5 баллов.

При количественном учете реакции пробу с начальным сгустком отмывают 5–8 мл дистиллированной воды, осаждая сгусток в течение 2–3 мин при комнатной температуре. При необходимости сгусток центрифугируют при 1000 об/мин в течение 1 мин, надосадок сливают. К осадку нераспавшейся ГК добавляют 0,5 мл смеси равных объемов 1 н HCl и концентрированной серной кислоты. Для экстракции риванола пробы прогревают при $t = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1–2 мин.

После экстракции хромогена 0,2 мл пробы вносят в стандартный планшет для ИФА и фотометрируют на мультискане АИФ М/340 (методика № 1, максимум поглощения светофильтра — 405 нм).

Гиалуронидазную активность (ГА) определяют по формуле:

$$\text{ГА} = [(\text{E}_\text{к} - \text{E}_\text{о})/\text{E}_\text{к}] \times 100\%,$$

где ГА — гиалуронидазная активность, выраженная в условных единицах (УЕ), $\text{E}_\text{к}$ — оптическая плотность контрольных проб, $\text{E}_\text{о}$ — оптическая плотность опытных проб.

Полученное значение умножают на разведение сыворотки или синовиальной жидкости.

Постановка метода определения ДНКазной активности сывороток, синовиальной жидкости, иммуноглобулинов

Метод определения основан на образовании сгустка риванола с ДНК обратно пропорционально деполимеризации последней под действием ДНКазной активности различного происхождения.

Определение ДНКазной активности сывороток крови больных и здоровых лиц

Полученную сыворотку крови больного разводят физиологическим раствором. Постановку реакции проводят в центрифужных пробирках. К 0,1 мл разведенной 1/5, 1/10 и 1/20 сыворотки прибавляют 0,2 мл стандартизованного раствора ДНК и 0,1 мл 0,02 М трис-НСl буфера, содержащего 0,01 М MgCl₂, рН 8,3. Пробы ставят в дублях. Для контролей используется 0,02 М трис-НСl буфер, рН 8,3, не содержащий солей магния, что блокирует ДНКазную активность, а также сыворотка донора, не проявляющая собственной ДНКазной активности в разведении 1/5. Пробы инкубируют при 37 °С в течение 2 ч. После инкубации к пробам прибавляют по 20 мкл 0,75% риванола. Результат оценивают по образованию сгустка.

При визуальном учете реакцию сгусткообразования оценивают в баллах. Отсутствие активности — компактный сгусток — 0 баллов; минимальная активность — рыхлый сгусток — 1 балл; слабая активность — рыхлый сгусток, хлопья, нити — 2 балла; умеренная активность — хлопья, нити — 3 балла; высокая активность — распад сгустка, хлопья, нити — 4 балла; максимальная активность — полный распад сгустка ДНК с образованием гомогенной взвеси — 5 баллов.

При количественном учете реакции по окончании инкубации проводят экстракцию хромогена риванола из сгустка. Для этого пробу с начальным сгустком отмывают однократно дистиллированной водой, надосадов сливают.

К осажденному сгустку добавляют 0,5 мл смеси равных объемов 1 н НСl и концентрированной серной кислоты. Для экстракции риванола пробы прогревают при $t = 100\text{ }^{\circ}\text{C}$ в течение 1–2 мин.

Далее 0,2 мл пробы вносят в стандартный планшет для ИФА и фотометрируют на мультискане АИФ М/340 (методика № 1, максимум поглощения светофильтра — 405 нм).

Величину ДНКазной активности (ДА) определяют по убыли оптической плотности в опытных пробах в сравнении с контролем.

Результат выражают в условных единицах. При этом из среднего значения оптической плотности контрольных проб вычитают среднее значение опытных проб и делят этот показатель на среднее значение контролей.

Формула для определения ДНКазной активности (ДА):

$$\text{ДА} = [(E_{\text{к}} - E_{\text{о}})/E_{\text{к}}] \times 100\%,$$

где ДА — ДНКазная активность, выраженная в условных единицах (УЕ), E_k — оптическая плотность контрольных проб, E_o — оптическая плотность опытных проб.

Полученное значение умножают на разведение сыворотки.

Определение ДНКазной абзимной активности в препаратах иммуноглобулинов, выделенных из сывороток крови больных и здоровых лиц

Реакция ставится в дублях. К 0,2 мл раствора ДНК добавляют 0,1 мл препарата IgG (1 мг/мл) и 0,1 мл трис-НСl буфера, рН 7,4 с 0,01 М $MgCl_2$.

В контроле вместо 0,1 мл иммуноглобулинов используют 0,1 мл 0,9% NaCl. Постановка реакции осуществляется в центрифужных пробирках. После инкубации в течение 20 ч при 37 °С на поверхность проб наслаивают 20 мкл 0,75% раствора риванола и встряхивают до получения сгустка.

Учет реакции и определение активности проводят, как описано выше.

Определение ДНКазной активности в синовиальной жидкости больных с заболеваниями суставов

Определение ДНКазной активности в синовиальной жидкости проводят также, как и в препаратах иммуноглобулинов. Полученную синовиальную жидкость предварительно разводят 1/10 и 1/20 физиологическим раствором. В реакции используют 0,02 М трис-НСl буфер с 0,01 М $MgCl_2$, рН 8,3.

Учет реакции и определение активности проводят, как описано выше.

В качестве примера использования предлагаемых методик приводятся результаты определения каталитической (ДНКазной и гиалуронидазной) деполимеризующей активности сывороток крови у пациентов со спондилоартропатиями.

Рандомизированным методом отобрано и обследовано: на ДНКазную активность сывороток крови 121 пациент со спондилоартропатиями (59 пациентов с псориатическим артритом, 33 — с реактивными урогенными артритами и 29 — с анкилозирующим спондилитом); на гиалуронидазную активность сывороток крови обследовано 67 пациентов со спондилоартропатиями (29 больных с псориатическим артритом, 18 — с анкилозирующим спондилитом, 20 — с реактивными урогенными артритами). Контрольной группой послужили 39 здоровых лиц.

Результаты определения уровней ДНКазной и гиалуронидазной активности сывороток у больных и здоровых лиц представлены в таблице.

Уровни ДНКазной и гиалуронидазной активности сывороток крови у больных спондилоартропатиями и у здоровых лиц (разведение 1/5 и 1/100 соответственно)

Обследованные лица	ДНКазная активность сывороток, баллы (разведение 1/5)	Гиалуронидазная активность сывороток, баллы (разведение 1/100)
Все обследованные пациенты	3,1±0,13; n = 121	3,15±0,17; n = 67
Пациенты с псориатическим артритом	4,1±0,13; n = 59	4,38±0,18; n = 29
Пациенты с анкилозирующим спондилитом	1,7±0,13; n = 29	1,94±0,17; n = 18
Пациенты с реактивными артритами	2,5±0,19; n = 33	2,8±0,28; n = 20
Здоровые лица	1,59±0,09; n = 39	1,26±0,016; n = 39

Уровни ДНКазной и гиалуронидазной активности у больных спондилоартропатиями достоверно отличались от контрольных значений ($p < 0,001$). При сравнении уровней сывороточной ДНКазной и гиалуронидазной активности у пациентов со спондилоартропатиями оказалось, что данный вид активности у больных псориатическим артритом статистически достоверно превышает аналогичные показатели у больных анкилозирующим спондилитом ($p < 0,001$) и реактивными артритами ($p < 0,001$).

Из 59 обследованных с установленным псориатическим артритом ДНКазная активность сыворотки крови 4 балла и выше наблюдалась у 40 человек (68%), из 33 пациентов с реактивными артритами — у 7 (21%), из 29 пациентов с анкилозирующим спондилитом и у здоровых лиц данный уровень активности не выявлялся.

Из 29 пациентов с псориатическим артритом гиалуронидазную активность сыворотки 4 балла и более демонстрировали 25 человек (86%), среди 20 больных с реактивными артритами оказалось, что активность 4 балла и более присутствует у 4 больных (20%), среди 18 пациентов с анкилозирующим спондилитом и здоровых лиц данный уровень активности не выявлялся.

Оценка ДНКазной и гиалуронидазной активности сывороток крови у больных спондилоартропатиями демонстрирует достоверное преобладание этого параметра у больных псориатическим артритом по сравнению с другими заболеваниями из данной группы. Если за диагностический уровень псориатического артрита принять ДНКазную активность сыворотки крови

4 балла и выше, то чувствительность метода составляет 68%, а специфичность — 88,7%. Отношение правдоподобия положительного результата теста (ОП+) равно 6; отрицательного результата (ОП-) — 0,36.

Если за диагностический уровень для псориатического артрита принять гиалуронидазную активность 4 балла и более, то диагностическая чувствительность метода составляет 86,2%, а диагностическая специфичность — 89,5%, ОП+ равно 8,2, а ОП- — 0,15.

Согласно рекомендациям Американской коллегии ревматологов (Shojania K. Rheumatology: 2. What laboratory tests are needed? CMAJ, 2000. Vol. 162. P.743–746) наиболее полезными для диагностики ревматических заболеваний являются лабораторные тесты с ОП+>5 и ОП-<0,2; полезными — с ОП+>2 и ≤5, ОП->0,2 и ≤0,5; не имеющими пользы — с ОП+≤2 и ОП->0,5. Таким образом, использование определения ДНКазной активности сыворотки крови для дифференциальной диагностики спондилоартропатий является полезным, а определение гиалуронидазной активности — наиболее полезным диагностическим тестом.

ПЕРЕЧЕНЬ ВОЗМОЖНЫХ ОСЛОЖНЕНИЙ ИЛИ ОШИБОК ПРИ ВЫПОЛНЕНИИ И ПУТИ ИХ УСТРАНЕНИЯ

При постановке методики возможны следующие ошибки.

Некоторые партии ДНК и гиалуронової кислоты не обладают достаточной молекулярной массой для полноценного сгусткообразования. Субстрат необходимо предварительно тестировать на образование риванолового сгустка и впоследствии для постановки реакции использовать только проверенные серии субстратов гиалуронової кислоты и ДНК.