

Invenția se referă la medicină, în special la medicina de laborator, și poate fi folosită la determinarea etiologiei procesului patologic pulmonar, diagnosticul diferențial al proceselor patologice pulmonare, elaborarea procedurilor de tratament și monitorizare a evoluției stărilor patologice de etiologie micobacteriană și de altă etiologie.

Este cunoscută metoda de diagnostic al procesului patologic pulmonar, care se bazează pe determinarea activității adenozindezaminazei (ADA) în serul sangvin și care include incubarea probei de cercetat în mediul de incubare ce conține adenzină, stoparea reacției enzimice prin adăugarea consecutivă a unei soluții ce conține fenol și nitroprusiat de sodiu, apoi a soluției alcaline de hipoclorit de sodiu, iar după o incubare la 37°C se măsoară absorbanta la 620 nm a produsului colorat al reacției față de proba blanc care se montează la fel și care conține aceiași reactivi, dar proba de cercetat se înlocuiește cu o cantitate echivalentă de ser fiziologic. Determinarea activității enzimei se efectuează reieșind din curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard ce conține anionul de NH_4^+ . Creșterea nivelului seric al activității ADA în raport cu grupul martor permite de a stabili etiologia de natură tuberculoasă a procesului patologic pulmonar [1].

Dezavantajul acestei metode constă în sensibilitatea și specificitatea joasă, din care cauză activitatea ADA serică nu poate fi considerată o metodă adecvată pentru determinarea etiologiei procesului patologic pulmonar și diferențierea între tuberculoza pulmonară și alte infecții pulmonare.

Cea mai apropiată după esență și rezultatul obținut este metoda de determinare a etiologiei procesului patologic pulmonar care se bazează pe determinarea adenozindezaminazei în serul sangvin și lichidul pleural. Activitatea ADA în lichidul pleural egală cu 40 UI/l sau mai mare și în serul sangvin mai mare de 26 UI/l indică o probabilitate mare că pleurezia este de etiologie tuberculoasă [2].

Dezavantajul acestei metode constă în precizia și reproductibilitatea joasă a metodei, deoarece reacția de culoare se efectuează în condiții ce nu corespund condițiilor optimale. Un alt neajuns al metodei menționate constă în faptul că metoda descrisă este invazivă, deoarece prevede puncția venei cubitale sau puncția cavității pleurale. Pe de altă parte, metoda descrisă nu poate fi realizată în cazul când lichidul pleural nu poate fi obținut, de exemplu, în cazul refuzului pacienților de a efectua puncția pleurală sau prezența pleureziei „închistate”. Un alt neajuns al metodei menționate constă în faptul că nu asigură posibilitatea efectuării analizei în serie, ceea ce influențează negativ asupra productivității metodei. Metoda are eficiență economică joasă, deoarece prevede folosirea cantităților mari de reactivi costisitori.

Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unei metode mai exacte care ar permite de a mări sensibilitatea, specificitatea și reproductibilitatea metodei prin elaborarea condițiilor optimale de efectuare a reacției enzimice, fapt ce exclude dependența rezultatelor analizelor de concentrația reactivilor utilizați și, de asemenea, oferă posibilitatea efectuării analizei în serie, ceea ce influențează pozitiv asupra productivității metodei. Un alt avantaj al metodei constă în faptul că ea este neinvazivă, deoarece prevede folosirea sputei expectorate de pacienți.

Esența invenției constă în pregătirea probelor duble de cercetat, de control, blanc și standard, și anume în proba de cercetat se utilizează sputa prelevată de la pacient și un mediu de incubare, care conține 7,5...12,0 mM de adenzină cu concentrația finală 2,3...3,7 mM/l dizolvată în 0,05 M de soluție tampon de fosfat de potasiu cu pH 7,4; în proba de control se utilizează sputa prelevată de la pacient și un mediu de incubare, care conține 0,05 M de soluție tampon de fosfat de potasiu cu pH 7,4; în proba blanc se utilizează ser fiziologic și un mediu de incubare, care conține 7,5...12,0 mM de adenzină cu concentrația finală 2,3...3,7 mM/l, dizolvată în 0,05 M de soluție tampon de fosfat de potasiu cu pH 7,4; proba standard se pregătește analogic, dar proba de cercetat se înlocuiește cu o soluție standard de sulfat de amoniu, după care probele se incubează la temperatura de 37°C, timp de 30 min, apoi în probe se adaugă un amestec ce conține soluție de 1% de fenol și 0,5 mM nitroprusiat de sodiu, urmată de adăugarea unei soluții de 10% Na_3PO_4 ce conține 10 mM hipoclorit de sodiu pentru stoparea reacției enzimice, apoi probele se incubează la temperatura de 37°C, timp de 30 min; după incubare se măsoară absorbanta probelor pregătite la lungimea de undă 630 nm, apoi se determină activitatea adenozindezaminazei, concentrația proteinei în proba de cercetat, activitatea specifică a adenozindezaminazei, concentrația procentuală a limfocitelor în sângele periferic al pacientului și se determină coeficientul K, în cazul în care coeficientul K este mai mare de 19,7 se diagnostichează tuberculoza pulmonară.

Avantajul metodei constă în aceea că, la determinarea etiologiei procesului patologic pulmonar se mărește precizia și reproductibilitatea, se micșorează eroarea și cheltuielile de reagenți, crește productivitatea muncii. Prelucrarea materialului biologic în 2 probe paralele permite de a mări precizia și reproductibilitatea determinărilor, sensibilitatea și specificitatea metodei în comparație cu cea mai apropiată soluție. Aceasta permite de a depista mai precis modificările activității ADA în diferite stări patologice.

Metoda este neinvazivă, deoarece nu prevede puncția tegumentelor dermale, astfel se evită complicațiile legate de contaminarea cu infecții suplimentare (SIDA, hepatitele virale etc.).

Metoda se efectuează în modul următor: se pregătesc probele duble de cercetat, de control, blanc și standard, și anume în proba de cercetat se picură în godeuri sputa prelevată de la pacient și un mediu de incubare, care conține 7,5...12,0 mM de adenzină cu concentrația finală 2,3...3,7 mM/l dizolvată în 0,05 M de soluție tampon de fosfat de potasiu cu pH 7,4; în proba de control se picură sputa prelevată de la pacient și un mediu de incubare, care conține 0,05 M de soluție tampon de fosfat de potasiu cu pH 7,4; în proba blanc se picură ser fiziologic și un mediu de incubare, care conține 7,5...12,0 mM de adenzină cu concentrația finală 2,3...3,7 mM/l dizolvată în 0,05 M de soluție tampon de fosfat de potasiu cu pH 7,4; proba standard se pregătește analogic, dar proba de cercetat se înlocuiește cu o soluție standard de sulfat de amoniu, după care probele se incubează la temperatura de 37°C, timp

de 30 min, apoi în probe se picură un amestec ce conține soluție de 1% de fenol și 0,5 mM nitroprusiat de sodiu, urmată de adăugarea unei soluții de 10% Na₃PO₄ ce conține 10 mM hipoclorit de sodiu pentru stoparea reacției enzimaticе, apoi probele se incubează la temperatura de 37°C, timp de 30 min; după incubare se măsoară absorbanta probelor pregătite la lungimea de undă 630 nm, apoi se determină activitatea adenozindezaminazei (ADA), unde valorile absorbantei sunt valorile medii ale probelor duble, conform formulei, (nM/s/l):

$$\text{activitatea ADA} = [(Apr - Ac) / (Ast - Ab)] \times [Cst / 180]$$

unde:

Apr - absorbanta probei de cercetat;

Ast - absorbanta probei standard;

Ab - absorbanta probei blanc;

Ac - absorbanta probei control;

Cst - concentrația probei standard;

180 - timpul de incubare, s;

apoi se stabilește concentrația proteinei în proba de cercetat, după care se determină activitatea specifică a adenozindezaminazei conform formulei, (nM/s/g prot.):

$$\text{activitatea specifică ADA}_{sp} = ADA / P,$$

unde:

ADA - activitatea ADA în sputa pacientului (nM/s/l),

P - concentrația de proteină în spută, (g/l);

apoi se determină concentrația procentuală a limfocitelor în sângele periferic al pacientului și se determină coeficientul K conform formulei:

$K = \text{activitatea specifică ADA} / \text{concentrația procentuală a limfocitelor în sângele periferic}$ și în cazul în care coeficientul K este mai mare de 19,7, se diagnostichează tuberculoza pulmonară.

Atunci când coeficientul K este egal sau mai mare de 19,7 se stabilește etiologia de origine tuberculoasă a procesului patologic, iar dacă coeficientul K este mai mic de 19,7, atunci se stabilește că procesul patologic este de altă etiologie.

Rezultatul invenției constă în mărirea sensibilității, specificității și reproductibilității metodei de determinare a etiologiei procesului patologic pulmonar și micșorarea probabilității complicațiilor legate de contaminarea cu infecții suplimentare (SIDA, hepatitele virale etc.), deoarece metoda nu este invazivă.

Exemplul 1

Pacientul D., 52 ani. Pneumonie severă. Concentrația de limfocite în sângele periferic - 37%.

Se determină activitatea specifică a ADA, pentru aceasta 20 μl material de cercetat – spută, se pipetează în duplicat în godeurile nr. 1 și 2 ale microplăcii cu 96 godeuri (proba de cercetat), apoi se adaugă câte 75 μl mediu de incubare ce conține 7,5 mM adenzină (concentrația finală 2,3 mM/l), dizolvată în 0,05 M de soluție tampon fosfat de potasiu cu pH 7,4. În godeurile nr. 3 și 4 ale microplăcii cu 96 godeuri (proba de control) se măsoară câte 20 μl material de cercetat - spută, se adaugă câte 75 μl mediu de incubare ce conține 0,05 M tampon fosfat de potasiu cu pH 7,4, dar nu conține adenzină. În godeurile nr. 5 și 6 (proba blanc) se măsoară câte 20 μl ser fiziologic, se pipetează câte 75 μl mediu de incubare ce conține 0,05 M tampon fosfat de potasiu cu pH 7,4 și 7,5 mM adenzină (concentrația finală 2,3 mM/l). Se agită și se incubează 30 min la 37°C. După finisarea incubației se adaugă 75 μl reactiv ce conține 1,0% fenol și 0,5 mM nitroprusiat de sodiu, apoi imediat se adaugă 75 μl soluție de 10% Na₃PO₄ ce conține 10 mM hipoclorit de sodiu. În continuare, probele se țin la 37°C 30 min, după care se măsoară absorbanta la 630 nm. În mod analogic, în duplicat se montează proba standard, care se prelucrează la fel, dar proba de cercetat se înlocuiește cu 20 ml soluție standard 4 mmol/l sulfat de amoniu - (NH₄)₂SO₄.

La măsurarea absorbantei s-a obținut:

Absorbanta probei de cercetat 0,463;

Absorbanta probei standard 0,510;

Absorbanta probei de control 0,065;

Absorbanta probei blanc 0,047.

Notă: *- sunt prezentate valorile medii ale absorbantei a 2 determinări paralele.

Mai întâi se calculează activitatea ADA în nM/s/l conform formulei:

$$ADA \text{ (nM/s/l)} = [(Apr - Ac) / (Ast - Ab)] \times [Cst / 180],$$

unde: Apr - absorbanta probei de cercetat;

Ast - absorbanta probei standard;

Ab - absorbanta probei blanc;

Ac - absorbanta probei control;

Cst - concentrația probei standard - 4,0 mM/l;

180 - timpul de incubare, s.

În cazul dat, activitatea ADA (nM/s/l) = $[(0,463 - 0,065) / (0,510 - 0,047)] \times [4,0 / 180] = 19102,2 \text{ nM/s/l}$.

În continuare, se determină concentrația de proteină în proba de cercetat – spută, cu ajutorul kiturilor de analiză, conform instrucțiunilor anexate la kit. În cazul dat concentrația de proteină (P) în sputa pacientului: P = 44,4 g/l. Apoi, se calculează activitatea specifică a ADA în proba de cercetat după formula:

$$ADA_{sp} \text{ (nM/s/g prot)} = ADA \text{ (nM/s/l)} / P,$$

unde: ADA (nM/s/l) - activitatea ADA în sputa pacientului;

P - concentrația de proteină în spută, g/l.

$$ADA \text{ (nM/s.g prot)} = 19102,2/44,4 = 430,0.$$

Concentrația procentuală de limfocite în sângele periferic al pacientului constituie 37%.

În continuare, se calculează coeficientul K – activitatea specifică a ADA (nM/s/g prot) se raportează la concentrația procentuală de limfocite în sângele periferic al pacientului – 37%.

$$\text{Coeficientul } K = 430/37 = 11,6.$$

În cazul dat coeficientul K este mai mic de 19,7, ceea ce ne permite de a stabili etiologia de natură non-tuberculoasă a procesului patologic pulmonar.

Exemplul 2

Pacientul T., 60 ani. Tuberculoză pulmonară infiltrativă. Concentrația de limfocite în sângele periferic - 31%.

Se determină activitatea specifică a ADA, pentru care 20 μl material de cercetat – spută, se pipetează în duplicat în godeurile nr. 1 și 2 ale microplăcii cu 96 godeuri (proba de cercetat), apoi se adaugă câte 75 μl mediu de incubare ce conține 0,05 M tampon fosfat de potasiu cu pH 7,4 și 12,0 mM adenzină (concentrația finală 3,7 mM/l). În godeurile nr. 3 și 4 ale microplăcii cu 96 godeuri (proba de control) se măsoară 20 μl material de cercetat, se pipetează 75 μl mediu de incubare ce conține 0,05 M tampon fosfat de potasiu cu pH 7,4, dar nu conține adenzină. În godeurile nr. 5 și 6 (proba blank) se măsoară 20 μl ser fiziologic, se pipetează 75 μl mediu de incubare ce conține 0,05 M tampon fosfat de potasiu cu pH 7,4 și 12,0 mM adenzină. Se agită și se incubează 30 min la 37°C. După finisarea incubăției se adaugă 75 μl reactiv ce conține 1,0% fenol și 0,5 mM nitroprusiat de sodiu, apoi imediat se adaugă 75 μl soluție de 10% Na₃PO₄ ce conține 10 mM hipoclorit de sodiu. În continuare, probele se agită 15 s și se țin la 37°C 30 min, după care se măsoară absorbanta la 620 nm. În mod analogic, se montează proba standard, care se prelucrează la fel, dar proba de cercetat se înlocuiește cu 20 ml soluție standard 5 mmol/l sulfat de amoniu - (NH₄)₂SO₄.

La măsurarea absorbantei* s-a obținut:

Absorbanta probei de cercetat 0,484;

Absorbanta probei standard 0,560;

Absorbanta probei de control 0,078;

Absorbanta probei blank 0,052.

Notă: *- sunt prezentate valorile medii ale absorbantei a 2 determinări paralele.

Mai întâi se calculează activitatea ADA în nM/s/l conform formulei:

$$ADA \text{ (nM/s/l)} = [(Apr - Ac) / (Ast - Ab)] \times [Cst/180],$$

unde: Apr - absorbanta probei de cercetat;

Ast - absorbanta probei standard;

Ab - absorbanta probei blank;

Ac - absorbanta probei control;

Cst - concentrația probei standard - 5,0 mM/l;

180 - timpul de incubare, s.

$$\text{În cazul dat, activitatea ADA (nM/s/l)} = [(0,484 - 0,078) / (0,560 - 0,052)] \times 5,0 / 180 = 0,0222 \text{ mM/s/l} = 0,0222 \times 1000 = 22,2 \text{ } \mu\text{M/s/l}.$$

În continuare, se determină concentrația de proteină în proba de cercetat – spută, cu ajutorul kiturilor de analiză, conform instrucțiunilor anexate la kit. În cazul dat concentrația de proteină în sputa pacientului P = 28,6 g/l.

Apoi, se calculează activitatea specifică a ADA raportată la 1 g proteină după formula:

$$ADA_{sp} \text{ (nM/s/g prot)} = ADA \text{ (nM/s/l)} / P,$$

unde:

ADA (nM/s/l) - activitatea ADA în sputa pacientului;

P - concentrația de proteină în spută, g/l.

$$ADA \text{ (nM/s.g prot)} = (22,2/28,6) \times 1000 = 776,2.$$

Concentrația procentuală de limfocite în sângele periferic al pacientului constituie 31%.

În continuare, se calculează coeficientul K - activitatea ADA raportată la concentrația procentuală de limfocite în sângele periferic al pacientului – 10%.

$$\text{Coeficientul } K = 776,2/31 = 25,0.$$

În cazul dat coeficientul K este mai mare de 19,7, ceea ce ne permite de a stabili natura tuberculoasă a procesului patologic pulmonar.

Exemplul 3

Pacientul M., 52 ani. Tuberculoză pulmonară diseminată cu destrucție pulmonară. Concentrația de limfocite în sângele periferic - 10%.

Se determină activitatea specifică a ADA, pentru care 20 μl material de cercetat – spută, se pipetează în duplicat în godeurile nr. 1 și 2 ale microplăcii cu 96 godeuri (proba de cercetat), apoi se adaugă câte 75 μl mediu de incubare ce conține 0,05 M de soluție tampon fosfat de potasiu cu pH 7,4 și 12,0 mM adenzină (concentrația finală 3,7

mM/l). În godeurile nr. 3 și 4 ale microplăcii cu 96 godeuri (proba de control) se măsoară 20 μl material de cercetat, se pipetează 75 μl mediu de incubare ce conține 0,05 M tampon fosfat de potasiu cu pH 7,4, dar nu conține adenzină. În godeurile nr. 5 și 6 (proba blank) se măsoară 20 μl ser fiziologic, se pipetează 75 μl mediu de incubare ce conține 0,05 M tampon fosfat de potasiu cu pH 7,4 și 12,0 mM adenzină. Se agită și se incubează 30 min la 37°C. După finisarea incubăției se adaugă 75 μl reactiv ce conține 1,0% fenol și 0,5 mM nitroprusiat de sodiu, apoi imediat se adaugă 75 μl soluție de 10% Na₃PO₄ ce conține 10 mM hipoclorit de sodiu. În continuare, probele se agită 15 s și se țin la 37°C 30 min, după care se măsoară absorbanta la 620 nm. În mod analogic, se montează proba standard, care se prelucrează la fel, dar proba de cercetat se înlocuiește cu 20 ml soluție standard 6 mmol/l sulfat de amoniu - (NH₄)₂SO₄.

La măsurarea absorbantei s-a obținut:

Absorbanta probei de cercetat 0,846;

Absorbanta probei standard 0,610;

Absorbanta probei de control 0,075;

Absorbanta probei blank 0,044.

Notă: *- sunt prezentate valorile medii ale absorbantei a 2 determinări paralele.

Mai întâi se calculează activitatea ADA în nM/s/l conform formulei:

$$ADA \text{ (nM/s/l)} = [(Apr - Ac) / (Ast - Ab)] \times [Cst / 180],$$

unde:

Apr - absorbanta probei de cercetat;

Ast - absorbanta probei standard;

Ab - absorbanta probei blank;

Ac - absorbanta probei control;

Cst - Concentrația probei standard - 6,0 mM/l;

180 - timpul de incubare, s.

În cazul dat, activitatea ADA (nM/s/l) = $[(0,846 - 0,075) / (0,610 - 0,044)] \times [6,0 / 180] = 0,0454 \text{ mM/s/l} = 0,0454 \times 1000 = 45,4 \mu\text{M/s/l}$.

În continuare, se determină concentrația de proteină în proba de cercetat – spută, cu ajutorul kiturilor de analiză, conform instrucțiunilor anexate la kit. În cazul dat concentrația de proteină în sputa pacientului P = 47,9 g/l.

Apoi, se calculează activitatea specifică a ADA raportată la 1 g proteină după formula:

$$ADA_{sp} \text{ (nM/s/g prot)} = ADA \text{ (nM/s/l)} / P,$$

unde:

ADA (nM/s/l) - activitatea ADA în sputa pacientului;

P - concentrația de proteină în spută, g/l.

$$ADA \text{ (nM/s.g prot)} = (45,4 / 47,9) \times 1000 = 947,8.$$

Concentrația procentuală de limfocite în sângele periferic al pacientului constituie - 10%.

În continuare, se calculează coeficientul K - activitatea ADA raportată la concentrația procentuală de limfocite în sângele periferic al pacientului - 10%.

$$\text{Coeficientul } K = 947,8 / 10 = 94,8.$$

În cazul dat coeficientul K este mai mare de 19,7, ceea ce ne permite de a stabili natura tuberculoasă a procesului patologic pulmonar.

Analogic exemplelor de mai sus au fost cercetate și alte concentrații ale soluției de adenzină (5...15 mM/l). Experiențele au permis de a stabili valorile limită optimale ale soluției de adenzină 7,5...12,0 (concentrația finală 2,3...3,7 mM/l), pentru obținerea efectului pozitiv.

Analizele au fost efectuate în Laboratorul Biochimie și Laboratorul Imunologie și Alergologie al IFP (în volum de 300 analize), iar rezultatele obținute au permis de a argumenta efectul pozitiv și avantajul metodei propuse față de prototip. La folosirea metodei descrise se mărește sensibilitatea, specificitatea și reproductibilitatea metodei de determinare, se micșorează eroarea și cheltuielile de reagenți, crește productivitatea muncii cu un efect economic apreciabil.