

**МИНИСТЕРСТВО ЗДРАВООХРАНЕНИЯ
РЕСПУБЛИКИ БЕЛАРУСЬ**

УТВЕРЖДАЮ
Первый заместитель министра

_____ Р.А. Часнойть
27 июня 2008 г.
Регистрационный № 015-0308

**СПОСОБ ДИАГНОСТИКИ ПЛЕВРИТА ТУБЕРКУЛЕЗНОЙ
ЭТИОЛОГИИ НА ОСНОВАНИИ ОПРЕДЕЛЕНИЯ АКТИВНОСТИ
АДЕНОЗИНДЕЗАМИНАЗЫ В СЫВОРОТКЕ КРОВИ
И В ПЛЕВРАЛЬНОЙ ЖИДКОСТИ**

инструкция по применению

УЧРЕЖДЕНИЯ-РАЗРАБОТЧИКИ: УО «Белорусский государственный
медицинский университет», ГУ «НИИ пульмонологии и фтизиатрии»

АВТОРЫ: д-р мед. наук, проф. А.Д. Таганович, д-р мед. наук, проф.
Г.Л. Гуревич, С.М. Алинежад, Ф.И. Захаревский

Минск 2008

Данная инструкция предназначена для врачей-пульмонологов, фтизиатров и врачей лабораторной диагностики.

Уровень внедрения: биохимические отделы и клиничко-диагностические лаборатории, туберкулезные и пульмонологические отделения стационаров, противотуберкулезных диспансеров.

Показания для определения активности аденозиндезаминазы (АДА) в плевральной жидкости и сыворотке крови

1. Наличие жидкости в плевральной полости.
2. Невозможность по каким-либо причинам произвести плевральную пункцию или извлечь для исследования плевральную жидкость.

Получение материала для исследования

У пациентов отбирают 6 мл венозной крови. Для постановки эксперимента необходимо использование сыворотки или плазмы крови без признаков гемолиза. Добавление оксалата (1 мг/мл), цитрата (1 мг/мл), ЭДТА (1 мг/мл) или очищенного от фенола гепарина (0,2 мг/мл) не препятствует проведению исследования. Не рекомендуется добавление фторидов. Образцы крови в течение 7 мин центрифугируют при 1500 g, отделяют образовавшуюся сыворотку или плазму и помещают ее в холодильник (температура 2–8 °С).

В аналогичных условиях замораживают образцы плевральной жидкости, полученные с помощью плевроцентеза и последующего центрифугирования в течение 10 мин при 1500 g.

Стабильность фермента в исследуемом образце

Исследуемые образцы хранятся при 4 °С не дольше 48–72 ч, дальнейшее хранение сыворотки приводит к высвобождению аммиака и, как следствие, искажению получаемых результатов.

Принцип метода:

1. Аденозин + H₂O $\xrightarrow{\text{АДА}}$ инозин + NH₃
2. NH₃ + ClO₂⁻ \longrightarrow NH₂Cl + OH⁻
3. NH₂Cl + фенол + OH⁻ + ½ O₂ \longrightarrow индофенол + Cl⁻ + 2H₂O

Равновесие ферментативной реакции смещено в сторону образования аммиака. Катализируемая АДА реакция останавливается в конце периода инкубации путем добавления фенольно-нитропруссидного раствора, а образовавшийся аммиак в присутствии гипохлорита натрия и фенола в щелочном растворе образует индофенол, имеющий интенсивную синюю окраску. Нитропруссид натрия является катализатором данного процесса. Концентрация образующегося аммиака прямо пропорциональна степени поглощения индофенола.

Необходимое оборудование и условия измерения

Фотометр или спектрофотометр, центрифуга, термостат или водяная баня (37 °С). Оптимальная длина волны измерения оптической плотности окрашенных растворов — 620 нм, ширина кювет — 10 мм. В качестве раствора сравнения используется дистиллированная вода.

Реагенты и растворы

Чистота реагентов: Все реагенты должны быть пригодны для проведения аналитических методов анализа. Растворы должны быть приготовлены на дистиллированной воде.

Приготовление растворов (примерно для 20 определений):

1. Фосфатный буфер (50 ммоль/л; pH 6,5). Растворить 5,35 г $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ и 5,62 г $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ в дистиллированной воде и довести полученный раствор дистиллированной водой до объема 1000 мл.

2. Буферный раствор аденозина (аденозин 21 ммоль/л, фосфатный буфер, 50 ммоль/л, pH 6,5). К 280 мг аденозина, находящегося в мерной колбе объемом 50 мл, добавить 30 мл фосфатного буфера (1), нагреть на водяной бане и охладить под проточной водопроводной водой. Довести объем до 50 мл фосфатным буфером.

3. Основной раствор сульфата аммония (15 ммоль/л). Растворить 1,982 г безводного сульфата аммония в дистиллированной воде, довести объем до 1000 мл и тщательно перемешать.

4. Стандартный раствор сульфата аммония (75 мкмоль/л). 0,5 мл основного раствора сульфата аммония доводят фосфатным буфером до объема 100 мл.

5. Фенольно-нитропруссидный раствор (фенол 106 ммоль/л, нитропруссид натрия — 0,17 ммоль/л). 10 г фенола и 50 мг нитропруссид натрия растворяют примерно в 500 мл воды, а затем доводят объем до 1000 мл.

6. Щелочной раствор гипохлорита натрия (NaOCl 11 ммоль/л, NaOH 125 ммоль/л). Смешивают 125 мл 1 М раствора NaOH и 16,4 мл раствора гипохлорита натрия, содержащего 5% NaOCl . Полученную смесь разводят дистиллированной водой до объема 1000 мл.

Стабильность растворов

При температуре от 0 до 4 °С растворы сохраняют стабильность в течение 2 месяцев. Растворы (3)–(5) следует хранить в темных флаконах.

При 4 °С из раствора (2) может выкристаллизовываться аденозин, который можно вновь растворить при нагревании колбы, однако эти манипуляции сопровождаются выбросом небольшого количества аммиака. Поэтому, чтобы получить раствор, не содержащий аммиака, раствор необходимо готовить ежедневно.

Раствор (5) не следует использовать, если он приобрел коричневую окраску.

Порядок выполнения исследования

Вносимые реагенты	Контроль реагентов	Стандартный раствор	Контроль образца	Опытная проба
Фосфатный буфер (1)	1,00 мл	–	–	–
Буферный раствор аденозина (2)	–	–	1,00 мл	1,00 мл
Стандартный раствор сульфата аммония (4)	–	1,00 мл	–	–
Образец (сыворотка крови, плевральная жидкость)	–	–	–	0,05 мл
Дистиллированная вода*	0,05 мл	0,05 мл	–	–
Перемешать и запечатать пробирки пленкой, инкубировать в течение 60 мин при 37 °С на водяной бане				
Фенольно-нитро-пруссидный раствор (5)	3,0 мл	3,0 мл	3,0 мл	3,0 мл
Образец (сыворотка крови, плевральная жидкость)	–	–	0,05 мл	–
Щелочной раствор гипохлорита (6)	3,0 мл	3,0 мл	3,0 мл	3,0 мл
Перемешать и инкубировать в течение 30 мин при 37 °С на водяной бане, после чего измерить светопоглощение растворов на спектрофотометре				

* Добавление дистиллированной воды не является абсолютно необходимым условием, ее отсутствие не приводит к искажению результата.

Если светопоглощение опытной пробы превышает 1,000, следует развести исследуемый образец водой в 2–5 раз и повторить измерения.

Расчеты

Величину оптической плотности опытной и стандартной проб корректируют путем вычитания оптической плотности соответствующих величин контроля на реагенты и образец:

$$\Delta D_{\text{образца}} = D_{\text{опытной пробы}} - D_{\text{контроля на образец}}$$

$$\Delta D_{\text{стандарта}} = D_{\text{стандартной пробы}} - D_{\text{контроля на реагенты}}$$

Каталитическую активность АДА в исследуемой пробе в МЕ/л (b) определяют по формуле [G. Giusti и B. Galanti (In: Bergmeyer, H.U. (ed.).

Methods of Enzymatic Analysis. — Weinheim: Verlag Chemie, 1984. — P. 315–323):

$$b = \frac{\Delta D_{\text{образца}}}{\Delta D_{\text{стандарта}}} \times 50$$

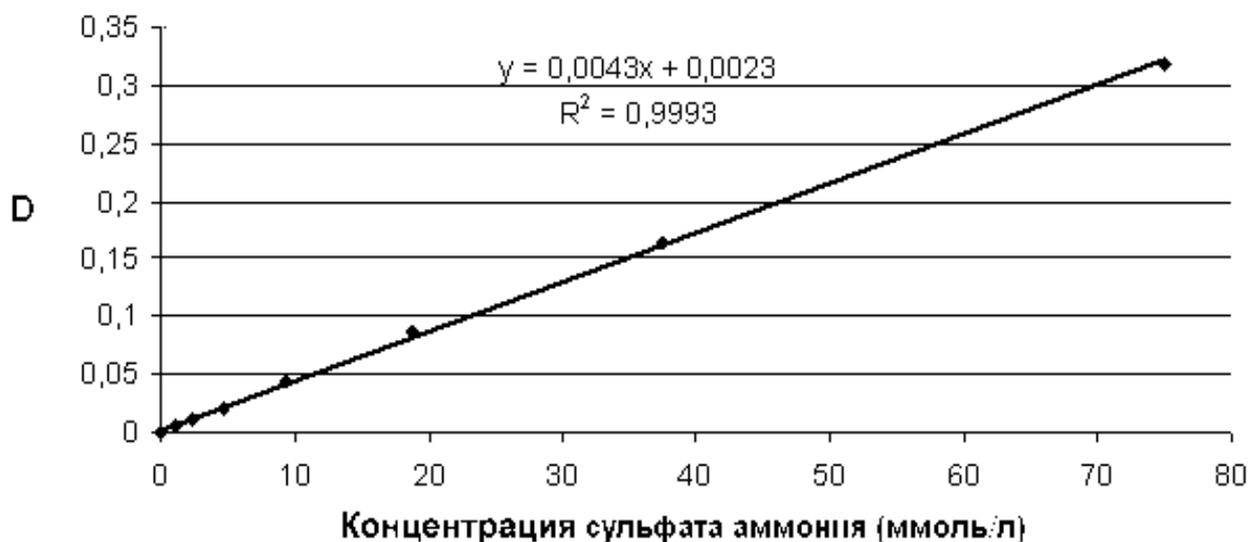


Рис. 1. График зависимости светопоглощения раствора от концентрации в нем сульфата аммония

Клинико-диагностическое значение

Активность АДА в плевральной жидкости, равная 40 МЕ/л или выше, а в сыворотке крови более 26 МЕ/л свидетельствует о большой вероятности плеврита туберкулезной этиологии.

Как показывают исследования, заявляемый способ весьма эффективен. Диагностическая чувствительность АДА в плевральной жидкости составляет 93,0%, в сыворотке крови — 80,0%; специфичность — соответственно 96,7 и 83,3%. Высокие показатели чувствительности и специфичности определения АДА в сыворотке крови позволяют использовать метод даже в тех случаях, когда плевральную жидкость получить не удастся, например, при отказе больных от плевральной пункции или наличии «осумкованного» плеврита.

Метод обладает не только клинической, но и экономической эффективностью, поскольку прост в исполнении, не требует дорогого оборудования и реагентов. Результат может быть получен в течение 2 ч.