



MD 2095 G2 2003.02.28

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Protecția Proprietății Industriale

(11) 2095 (13) G2
(51) Int. Cl.⁷: A 61 B 5/00

(12) BREVET DE INVENȚIE

(21) Nr. depozit: a 2002 0128 (22) Data depozit: 2002.04.22	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2003.02.28, BOPI nr. 2/2003
(71) Solicitant: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	
(72) Inventatori: CEREMPEI Ludmila, MD; MOGOREANU Petru, MD; GUDUMAC Valentin, MD; SCHIȚCO Olga, MD; COLIBABA Elena, MD	
(73) Titular: UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD	
(74) Reprezentant: VOZIANU Maria, MD	

(54) Metodă de diagnostic al funcției pancreatice la copii cu afecțiuni
gastroduodenale cronice

(57) Rezumat:

Invenția se referă la medicină, în special la gastroenterologia pediatrică.

Esența metodei constă în aceea că pentru diagnosticul funcției pancreasului se determină în lichidele biologice nivelul tripsinei și inhibitorilor ei:

1
2
5 alfa 1-antitripsină, alfa 2-macroglobulină, și anume ele se determină în saliva prelevată de la pacienți.
Revendicări: 1

MD 2095 G2 2003.02.28

3

Descriere:

Invenția se referă la medicină, mai concret la pediatrie și în special la gastroenterologia pediatrică.

În prezent este cunoscută metoda de diagnostic al funcției pancreatice pe baza determinării nivelului tripsinei și inhibitorilor ei: alfa1-antitripsinei și alfa2-macroglobulinei în serul sanguin.

5 Metoda se realizează în felul următor.

De la pacient se prelevă 5 ml de sânge, care apoi se centrifughează pentru a separa serul sanguin în care ulterior se determină nivelul tripsinei și inhibitorilor ei alfa1-antitripsinei și alfa2-macroglobulinei conform metodicii descrise mai jos.

10 Pentru determinarea activității tripsinei în microchiuvetele fotometrice ale analizatorului biochimic FP-901 se măsoară 0,025 ml din materialul cercetat (ser), se suplimentează cu 0,025 ml soluție de 0,9% NaCl și 0,4 ml soluție de 0,02% BAPNA. Microchiuvetele se agită și se incubează 60 min la 37°C. După incubare pentru stoparea reacției se adaugă 0,05 ml soluție de acid clorhidric 0,5 N și se agită. Se înregistrează densitatea optică a mediului de reacție la o lungime de undă de 410 nm în raport cu martorul, care este pregătit în mod similar, acidularea mediului fiind însă produsă până la

15 incubare. Calcularea activității enzimei se efectuează reieșind din curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitroanilină și se exprimă în nmol pe s la 1 g de țesut (nmol/s•g).

20 Pentru determinarea activității alfa1-antitripsinei în microchiuvetele fotometrice ale analizatorului biochimic FP-901 se măsoară 0,05 ml din materialul cercetat (ser diluat 1:32), se suplimentează cu 0,1 ml soluție-tampon medinal-HCl 0,05M cu pH 8,2, 0,1 ml soluție de 0,04% tripsină și 0,2 ml soluție de 0,06% BAPNA. Microchiuvetele se agită și după 10 min de preincubare la temperatura camerei se incubează 30 min la 37°C. După incubare pentru stoparea reacției se adaugă 0,05 ml soluție de acid clorhidric 0,5 N. Se înregistrează densitatea optică a mediului de reacție la o lungime de undă de 410 nm în raport cu apa distilată. La fel se înregistrează densitatea optică a mediului de referință, care este pregătit în mod similar, însă nu conține materialul cercetat. Aprecierea

25 proprietăților inhibitorilor de alfa1-antitripsină se realizează prin compararea gradului de hidroliză a substratului în prezența și în lipsa materialului cercetat. Pentru aceasta se calculează diferența dintre densitatea optică a probei de referință și celei experimentale. Calcularea activității enzimei se efectuează utilizând curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard

30 de p-nitroanilină și se exprimă în nmol/s la 1 g de țesut (nmol/s•g).

Pentru determinarea activității alfa2-macroglobulinei, în microchiuvetele fotometrice ale analizatorului biochimic FP-901 se măsoară 0,05 ml din materialul cercetat (ser diluat 1:32), se suplimentează cu 0,1 ml soluție-tampon medinal-HCl 0,05M cu pH 8,2, 0,1 ml soluție de 0,04% tripsină și 0,2 soluție de inhibitor al tripsinei. Microchiuvetele se agită și după 10 min de preincubare la temperatura camerei se incubează 30 min la 37°C. După incubare pentru stoparea reacției se adaugă 0,05 ml soluție de acid clorhidric 0,5 N. Se înregistrează densitatea optică a mediului de reacție la o lungime de undă de 410 nm în raport cu apa distilată. La fel se înregistrează densitatea optică a mediului de referință, care este pregătit în mod similar, însă nu conține materialul cercetat. Cantitatea de alfa 2-macroglobulină se exprimă în grame la litru de ser (g/L) [1, 2].

40 Dezavantajele acestei metode constau în aceea că ea este invazivă, traumatizantă și dificilă în realizare.

Problema pe care o rezolvă invenția dată constă în posibilitatea stabilizării funcției pancreatice la copii cu afecțiuni gastroduodenale cronice pe baza unei metode mai puțin costisitoare, neinvazive, atraumatizante, cât și simple în ce privește colectarea materialului de diagnostic de la pacienți.

45 Esența metodei constă în aceea că pentru diagnosticul funcției pancreasului se determină în lichidele biologice nivelul tripsinei și inhibitorilor ei: alfa 1-antitripsină, alfa 2-macroglobulină, și anume ele se determină în saliva prelevată de la pacienți.

Rezultatul obținut este diagnosticul funcției pancreatice rapid, simplu și necostisitor, atraumatic și neinvaziv.

50 Metoda se realizează în felul următor.

Dimineața după efectuarea igienei cavității bucale cu apă, timp de 10 min de la pacient se colectează saliva. Saliva se supune centrifugării cu rata de 4500 tur./min, timp de 5 min.

55 Pentru determinarea activității tripsinei în salivă, în microchiuvetele fotometrice ale analizatorului biochimic FP-901 se măsoară 0,025 ml din supernatant (salivă), se suplimentează cu 0,025 ml soluție de 0,9% NaCl și 0,4 ml soluție de 0,02% BAPNA. Microchiuvetele se agită și se incubează 60 min la 37°C. După incubare pentru stoparea reacției se adaugă 0,05 ml soluție de acid clorhidric 0,5 N și se agită. Se înregistrează densitatea optică a mediului de reacție la o lungime de undă de 410 nm în raport cu martorul, care este pregătit în mod similar, acidularea mediului fiind însă produsă până la

MD 2095 G2 2003.02.28

4

incubare. Calcularea activității enzimei se efectuează reeșind din curba de calibrare, construită în baza diluțiilor succesive ale soluției standard de p-nitroanilină și se exprimă în nmol/s la 1 g de țesut.

Pentru determinarea activității alfa1-antitripsinei în salivă, în microchiuvetele fotometrice ale analizatorului biochimic FP-901 se măsoară 0,05 ml din supernatant (salivă), se suplimentează cu 0,1 ml soluție-tampon medinal-HCl 0,05M cu pH 8,2, 0,1 ml soluție de 0,04% tripsină și 0,2 ml soluție de 0,06% BAPNA. Microchiuvetele se agită și după 10 min de preincubare la temperatura camerei se incubează 30 min la 37°C. După incubare pentru stoparea reacției se adaugă 0,05 ml soluție de acid clorhidric 0,5N. Se înregistrează densitatea optică a mediului de reacție la o lungime de undă de 410 nm în raport cu apa distilată. La fel se înregistrează densitatea optică a mediului de referință, care este pregătit în mod similar, însă nu conține materialul cercetat. Aprecierea proprietăților inhibitorilor de alfa1-antitripsină se realizează prin compararea gradului de hidroliză a substratului în prezența și în lipsa materialului cercetat. Pentru aceasta se calculează diferența dintre densitatea optică a probei de referință și celei experimentale. Calcularea activității enzimei se efectuează utilizând curba de calibrare, construită în baza unor diluții succesive ale soluției standard de p-nitroanilină și se exprimă în nmol/s la 1 g de țesut.

Pentru determinarea activității alfa2-macroglobulinei, în microchiuvetele fotometrice ale analizatorului biochimic FP-901 se măsoară 0,05 ml din supernatant (salivă), se suplimentează cu 0,1 ml soluție-tampon medinal-HCl 0,05M cu pH 8,2, 0,1 ml soluție de 0,04% tripsină și 0,2 ml soluție de inhibitor al tripsinei. Microchiuvetele se agită și după 10 min de preincubare la temperatura camerei se incubează 30 min la 37°C. După incubare pentru stoparea reacției se adaugă 0,05 ml soluție de acid clorhidric 0,5N. Se înregistrează densitatea optică a mediului de reacție la o lungime de undă de 410 nm contra apei distilate. La fel se înregistrează densitatea optică a mediului de referință, care este pregătit în mod similar, însă nu conține materialul cercetat. Cantitatea de alfa2-macroglobulină se exprimă în g/L de ser [1].

Metoda propusă a fost aplicată pe un eșantion de 188 de bolnavi dintre care 98 cu gastroduodenită cronică, 25 cu gastrită cronică, 68 cu afecțiuni erozivulceroase. Rezultatele obținute se interpretează în felul următor.

Nivelul tripsinei și inhibitorilor ei în perioada de acutizare

Indici	Sănătoși, N=25	Gastrită cronică, N=25	Gastroduodenită cronică, N=98	Afecțiuni erozivulceroase, N=65	p*
Tripsină (nmol/s•g)	24,60±0,78	128,00±5,13	144,40±4,80	150,80±2,61	P1-2<0,010 P1-3<0,001 P1-4<0,001 P2-3<0,050 P2-4<0,001
Alfa1- antitripsină (nmol/s•g)	4,63±0,20	6,70±0,12	5,97±0,26	7,71±0,18	P1-2<0,001 P1-3<0,001 P1-4<0,001 P2-3<0,010 P2-4<0,001 P3-4<0,001
Alfa2-macro- globulină (g/L)	0,96±0,03	1,40±0,11	1,48±0,03	1,67±0,13	P1-2<0,001 P1-3<0,001 P1-4<0,001

Notă: *p – indicele veridicității.

30

Exemplu 1. Bolnavul M., a.n. 1987, a fost examinat la policlinica republicană pentru copii pe data de 09.XI.1998. Diagnosticul de bază: gastroduodenită cronică eritematoasă cu hipersecreție și hiperaciditate în perioada de acutizare. În salivă a fost determinat nivelul tripsinei (141,3 nmol/s•g), alfa1-antitripsinei (6,4 nmol/s•g), alfa2-macroglobulinei (7,51 g/L). Rezultatul a stabilit hipersecreția pancreatică și majorarea alfa1-antitripsinei și alfa2-macroglobulinei ca manifestare a pancreatitei reactive.

Exemplu 2. Bolnavul A., a.n. 1981 a fost examinat la policlinica republicană pentru copii pe data de 28.IX.2002. Diagnosticul de bază: gastroduodenită cronică eritematoasă cu hipersecreție în perioada de acutizare. S-a efectuat analiza salivei, rezultatele obținute fiind următoarele: tripsină 145,4 nmol/s•g, alfa1-antitripsină 4,92 nmol/s•g, alfa2-macroglobulină 0,98 g/L.

Nivelul tripsinei și inhibitorilor ei confirmă majorarea secreției tripsinei și reducerea alfa1-antitripsinei și alfa2-macroglobulinei, ceea ce este caracteristic pentru pancreatita cronică.

40

MD 2095 G2 2003.02.28

5

(57) Revendicare:

5 Metodă de diagnostic al funcției pancreatice la copii cu afecțiuni gastroduodenale cronice ce constă în determinarea nivelului tripsinei, alfa1- antitripsinei, alfa2- macroglobulinei în lichidele biologice, **caracterizată prin aceea că** în calitate de lichid biologic se utilizează salivă.

10

(56) Referințe bibliografice:

1. Ипатов Ю.П., Комарова Л.Г., Шабунина Е.И. Ключи к проблеме гастроэнтерологических заболеваний у детей. Нижний Новгород, 1997
2. Баранов А.А., Климанская Е.В., Римарчук Г.В. Детская гастроэнтерология. Москва, 2002, с. 390-424

Șef Secție:	EGOROVA Tamara
Examinator:	GROSU Petru
Redactor:	ANDRIUȚĂ Victoria

RAPORT DE DOCUMENTARE

(21) Nr. depozit: a 2002 0128		
(22) Data depozit: 2002.04.22		
(51) ⁷ : A 61 B 5/00 Alți indici de clasificare: Titlul : Metodă de diagnostic al funcției pancreatice la copii cu afecțiuni gastroduodenale cronice (71) Solicitantul : UNIVERSITATEA DE STAT DE MEDICINĂ ȘI FARMACIE "NICOLAE TESTEMIȚANU" DIN REPUBLICA MOLDOVA, MD Termeni caracteristici : tripsina, alfa 1-antitripsină, alfa 2 - macroglobulină		
I. Minimul de documente consultate (sistema clasificării și indici de clasificare Int. Cl. (7))		
(MD, EA, SU) Int. Cl. ⁷ A 61 B 5/00 MD baza de date 1993-2002 nu sa-selectat EA colecția de reviste 1994-2002 nu sa-u selectat SU colecția de certificate de autor 1973-1991 nu sa-selectat		
II. Documente considerate ca relevante		
Categoria*	Date de identificare ale documentelor citate si indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
<input type="checkbox"/> Documentele următoare sunt indicate în continuare a rubricii II		<input type="checkbox"/> Informația referitoare la brevete paralele se anexează
* categoriile speciale ale documentelor consultate:		P - document publicat înainte de data de depozit dar după data priorității invocate
A - document care definește stadiul anterior general		T - document publicat după data de depozit sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria care conține baza invenției
E - document anterior dar publicat la data de depozit național reglementar sau după aceasta data		X - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă
L - document care poate pune în discuție data priorității invocate, poate contribui la determinarea datei publicării altor divulgări sau pentru un motiv expres (se va indica motivul)		Y - document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă cand documentul este asociat cu unul sau mai multe alte documente de aceeași natură, aceasta combinație fiind evidentă pentru o persoană de specialitate
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expunere sau orice altă		& - document care face parte din aceeași familie de documente
Data finalizării documentării	2002.12.05	
Examinatorul	Grosu Petru	