

UNIVERSITA' DEGLI STUDI DI SASSARI
FACOLTA' DI MEDICINA E CHIRURGIA

SCUOLA DI DOTTORATO DI RICERCA IN SCIENZE BIOMEDICHE
INDIRIZZO: PATOLOGIE INFETTIVE DEL VIAGGIATORE INTERNAZIONALE

ISTITUTO DI MALATTIE INFETTIVE

Direttore: Prof.ssa Maria Stella Mura

ADENOSINA DEAMINASI NELLA DIAGNOSI
DI INFEZIONE TUBERCOLARE

Tesi di Dottorato di Ricerca del

dott. Marco Cilliano

Tutore:

dott.ssa Ivana Maida

XXII Ciclo

Anno Accademico 2008-2009

Indice

Introduzione 2

Scopo del lavoro 11

Materiali e metodi 12

Risultati 20

Discussione 21

Conclusioni 23

Bibliografia 25

Abstract 28

Introduzione

L'incidenza della tubercolosi in Italia negli ultimi 25 anni è rimasta stabile. Fino agli anni '80 si era osservata invece una costante riduzione dei casi. Anche la malattia tubercolare ha subito cambiamenti: si è verificato un aumento dei casi di forme extrapolmonari e sono più colpite alcune fasce d'età e categorie a rischio. Inoltre sempre più frequente è il riscontro di germi multiantibiotico resistenti e "XDR", con ridotte possibilità terapeutiche. Queste variazioni rispetto al passato sono da attribuire in maggiore misura all'importazione di infezioni da altri paesi e alla correlazione con l'infezione da HIV.

Nel mondo la tubercolosi uccide più di 1800000 di persone ogni anno, la maggior parte della quali nell'Africa ad alta prevalenza di HIV e in Asia/Est Europa.

La diagnosi delle forme extrapolmonari (in particolare meningoencefalite e pleurite) può essere spesso difficoltosa o tardiva: un quadro clinico complesso e subdolo, a volte rapidamente progressivo e test di laboratorio negativi o tardivi non agevolano un inizio precoce della terapia specifica.

La determinazione dell'attività Adenosina Deaminasica (ADA), quale indice di attivazione monocito/macrofagica, è utile nella di-

agnosi di infezioni da agenti intracellulari. Valori elevati, dovuti ad un aumento dell'isoenzima "sierico" ADA2, in campioni di liquido infiammatorio (essudati pleurico, pericardio, ascitico, articolare, liquor) possono essere considerati marker indiretto di infezione tubercolare. Aumento dell'isoenzima "tissutale" ADA1 è stato invece riscontrato in corso di malattie proliferative o infezioni da piogeni comuni.

L'adenosina deaminasi (ADA) è una amino idrolasi essenziale per il catabolismo dei nucleotidi purinici, che catalizza la deaminazione della adenosina, producendo inosina e ammonio. In base al peso molecolare sono stati descritti tre isoenzimi: ADA1, pm 35000 D, codificato da un locus specifico sul cromosoma 20; ADA1+cp , 280000 D, composto probabilmente da due molecole di ADA1 con una proteina di combinazione; ADA2, pm 100000 D, codificata da un differente locus del cromosoma 20. Per la particolare distribuzione ADA1 è definito come enzima tissutale e ADA2 come enzima sierico(1).

Nell'uomo l'attività enzimatica differisce nel siero e nei tessuti per pH ottimale e per la relativa specificità per il substrato; peraltro l'attività enzimatica mostra proprietà simili nei diversi tessuti. L'isoenzima sierico e il tissutale sono distinguibili in base alla diversa affinità per l'analogo adenosinico 2deossiadenosina. Adenosina deaminasi reagisce in maniera specifica con l'adenosina e meno specifica con alcuni analoghi nucleosidici. La sua attività deri-

va dai due principali isoenzimi: ADA1, presente in tutti i tessuti, in particolare nei linfociti, monociti e globuli rossi, essenziale per una efficace risposta immune, con elevata affinità enzimatica per la 2deossiadenosina e l'adenosina (in rapporto di 0.75); ADA2, presente solo nei monociti e nei macrofagi, con scarsa affinità per la 2-deossiadenosina ed elevata per l'adenosina (in rapporto di 0.25) (2).

Il deficit congenito dell'isoenzima ADA1 si associa alla sindrome da severa immunodeficienza combinata (SCID), caratterizzata dall'incapacità a produrre un sufficiente numero di linfociti T e B maturi. Il dATP accumulato per la mancanza dell'enzima è un metabolita tossico e la sua concentrazione negli eritrociti dei pazienti affetti da SCID, correla con la severità della malattia. Si ritiene che l'aumento della produzione di dATP, che si riscontra nei pazienti affetti da questa patologia, inibisca la ribonucleotide difosfato reductasi bloccando la sintesi del DNA e di conseguenza la maturazione e la proliferazione dei linfociti. In modelli colturali di timociti fetali murini il deficit di adenosina deaminasi (ADA1) e il conseguente accumulo di dATP indurrebbe arresto della maturazione e apoptosi dei timociti mediata dal Bcl-2 (3).

Nell'uomo i linfociti midollari costituiscono il bersaglio di tecniche di terapia di sostituzione genica e la SCID è stata la prima malattia ereditaria trattata con terapia genica. Con questa procedura viene prelevato un certo numero di cellule midollari e il gene per l'

adenosina deaminasi, ottenuto da cellule normali, viene trasferito mediante l'utilizzo di vettori retrovirali nelle cellule del paziente poste in coltura. Successivamente le cellule vengono reiniettate al paziente, generando rapidamente una popolazione di linfociti, con completa correzione del deficit metabolico immunologico e beneficio clinico. Questi risultati hanno importanti implicazioni per future applicazioni della terapia genica in altre patologie del sistema emopoietico(4).

Alcuni studi hanno inoltre evidenziato un fisiologico decremento dell' ADA2 durante la gravidanza, che può essere in parte associato alla lieve depressione dell'immunità cellulo-mediata che normalmente si verifica durante la gestazione. (5)

L'attività ADA varia nelle malattie caratterizzate da risposta immunitaria cellulo-mediata, potendo esserne considerata un marker aspecifico. La letteratura riporta un aumento dell' adenosina deaminasi in diversi fluidi biologici in corso di infezioni da microrganismi intracellulari, epatopatie virali croniche, linfomi, leucemie e patologie autoimmuni.

Numerosi studi sono stati fatti sulla determinazione dell'attività ADA in corso di malattia tubercolare. In particolare nel liquor di pazienti affetti da meningite tubercolare sono stati riscontrati valori di ADA significativamente più elevati rispetto a quelli di pazienti con meningite batterica o virale, con notevole utilità pratica nel-

la diagnosi etiologica differenziale. Inoltre nella meningite tubercolare il dosaggio della attività enzimatica ripetuto su campioni di liquor in varie fasi della malattia, ha mostrato un progressivo decremento in parallelo col miglioramento della sintomatologia e del reperto liquorale. Risultati sovrapponibili sono stati ottenuti in pazienti affetti da neurobrucellosi, con o senza immunodeficit acquisito HIV correlato (6, 7).

In corso di peritonite tubercolare si riscontrano elevati livelli di Adenosina deaminasi nel liquido peritoneale, a differenza di più bassi livelli misurati in corso di carcinomatosi peritoneale, pancreatiti, insufficienza renale, cirrosi, insufficienza cardiaca (8).

Secondo alcuni autori il test avrebbe elevato potere diagnostico per etiologia tubercolare con sensibilità, specificità e accuratezza rispettivamente del 100%, 97% e 98.5% per valori di ADA = 45U/l (9).

Analogamente la determinazione della attività ADA si è mostrata utile nella diagnosi di pleurite tubercolare. Una metanalisi condotta su diversi studi svolti tra il 1966 e il 1999 ha stabilito una sensibilità e specificità entrambe del 92.2% per patologia tubercolare con valori di ADA = 40 U/l su liquido pleurico (10). Un ruolo del tutto simile potrebbe avere la determinazione quantitativa del tumor necrosis factor- α negli essudati pleurici, ma con costi di esecuzione notevolmente più elevati (11).

Elevati livelli di ADA nel liquido pleurico in corso di brucellosi sono difficilmente differenziabili da quelli raggiunti in corso di patologia tubercolare, pertanto in regioni con elevata endemia per entrambe le patologie questo dato potrebbe essere non dirimente.

Elevati valori di adenosina deaminasi possono essere riscontrati nel liquido ascitico e pleurico anche in corso di patologia neoplastica o empiematosa. In questi casi il rapporto Attività 2-deossiADA/ADA sarebbe di ulteriore ausilio: proprio per la diversa affinità dell'ADA2 (sierica) e ADA1 (tissutale) per i substrati 2-deossiadenosina e adenosina, un rapporto > 0.45 indicherebbe una produzione tissutale dell'enzima, escludendo una patologia infettiva da agenti intracellulari (12).

In un recente studio è stata analizzata la possibilità di eseguire il dosaggio di ADA in campioni di broncolavaggio alveolare di pazienti con esame batterioscopico su espettorato negativo per bacilli alcol-acido resistenti ma fortemente sospetti per patologia tubercolare polmonare. In questi pazienti il valore di ADA su liquido di lavaggio broncoalveolare avrebbe permesso una diagnosi precoce ed attendibile di infezione tubercolare con sensibilità e specificità (rispettivamente 100% e 85%) sovrapponibili a quelle ottenute con metodiche di biologia molecolare (PCR) su broncolavaggio alveolare, ma con tempi di esecuzione e costi notevolmente ridotti (13). Risultati analoghi sono stati ottenuti in uno studio comparativo tra

PCR e attività ADA condotto per la diagnosi di pericardite tubercolare, con determinazioni su liquido pericardico (14).

Recentemente sarebbe stata dimostrata l'utilità della determinazione sierica dell'attività ADA e degli isoenzimi ADA1 e ADA2, mediante il rapporto 2deossiADA/ADA, per la diagnosi ed il follow up in corso di terapia in 50 pazienti con tubercolosi polmonare (15). Il dosaggio sierico dell'ADA sarebbe altresì utile per un approccio e trattamento empirico in pazienti con polmonite acquisita in comunità: valori elevati indicherebbero la presenza di microrganismi atipici intracellulari (*Legionella*, *Mycoplasma* e *Chlamydia*) (16).

In uno studio condotto da Gakis, Piras et al. nel 1981 sono stati dimostrati elevati livelli sierici di ADA già al primo giorno di febbre in pazienti affetti da Febbre Eruttiva Mediterranea o Febbre Tifoide, con valori decrescenti nei campioni prelevati successivamente, quando la malattia era nel vivo delle manifestazioni cliniche ed iniziava ad essere significativo il tasso di anticorpi specifici, indice di una risposta immunitaria ormai completa. L'analogo comportamento enzimatico in corso di infezione da *Rickettsia conorii* o *Salmonella typhi* potrebbe quindi indicare che le due malattie hanno in comune lo stesso evento immunologico e, che l'ADA, tanto elevato in uno stadio preclinico della malattia ma senz'altro già definito per il sistema immune, sarebbe espressione di una serie di complesse interazioni tra macrofagi e sottopopolazioni lin-

focitarie, che intercorrono quando nell'organismo si sta approntando l'immunità cellulare.

Frequentemente in corso di infezione da HIV sarebbero riscontrabili elevati valori sierici di ADA, dovuti ad aumento dell'isoenzima ADA2, in particolare in un'alta percentuale di soggetti con infezione avanzata.

Tra le altre infezioni virali studiate anche mononucleosi infettiva, epatite A e B, mostrano incrementi sierici di ADA, sempre dovuti all'isoenzima ADA2 (17).

Anche in patologie non infettive possono essere riscontrati elevati livelli di ADA nel siero o nei vari liquidi biologici.

Nel liquido sinoviale di pazienti affetti da artrite reumatoide l'attività ADA è elevata per aumento della sintesi dell'isoenzima ADA1 da parte dei sinoviociti: questo contribuirebbe alla patogenesi dell'artrite reumatoide neutralizzando le proprietà antireumatiche dell'adenosina endogena (18).

In corso di malattie emolinfoproliferative sono stati riscontrati alterati livelli sierici di adenosina deaminasi. Nella leucemia mieloide acuta gli elevati valori dell'enzima correlerebbero con la severità della malattia, costituendo anche un indice prognostico negativo. Nella leucemia linfatica acuta è stata riportata un'attività sierica di ADA superiore rispetto ai controlli, e in particolare l'au-

mento dell'enzima era dovuto principalmente alla frazione tissutale, con rapporto 2-deossiADA/ADA > 0.50 (1,6). In corso di malattia di Hodgkin in fase avanzata vi sarebbero livelli di ADA sierica significativamente ridotti: questo dato sarebbe in accordo con la marcata depressione immunitaria cellulo-mediata (19).

Scopo del lavoro

Valutare l'utilità attuale del dosaggio dell'ADA quantitativo e qualitativo nella diagnosi di infezione tubercolare ed in particolare nella pleurite e nella meningite.

Materiali e metodi

Campione esaminato

Abbiamo effettuato la determinazione dell'attività adenosina deaminasica su:

-124 campioni di liquido cefalorachidiano provenienti da 118 pazienti ricoverati per meningite/meningoencefalite non tubercolare e da 6 pazienti affetti da meningoencefalite tubercolare. I pazienti con patologia non tubercolare erano affetti da meningite a liquor torbido, meningoencefalite da *Listeria monocytogenes*, meningoencefalite erpetica (HSV, 1 caso da HZV), sindrome di Guillan-Barré, meningite a liquor limpido ad etiologia non accertata.

-128 campioni di liquido pleurico provenienti da 110 pazienti con versamento pleurico non tubercolare e 18 pazienti affetti da pleurite tubercolare.

I pazienti con pleurite non tubercolare erano affetti da versamento pleurico parapneumonico, empiema pleurico, pleurite post-traumatica, neoplasia pleuropolmonare, versamento pleurico secondario a LNH (1 paziente)

Campioni provenienti da pazienti ricoverati presso l'Istituto di Malattie Infettive dell'Università degli Studi di Sassari o in altre strutture (in particolare l'Istituto di Pneumologia e l'Istituto di Neurologia dell'Università degli Studi di Sassari) nel periodo compreso tra il 2003 e il 2009.

Metodo per il dosaggio

Abbiamo utilizzato il metodo colorimetrico per la determinazione dell'attività adenosina deaminasica elaborato da Giusti e successivamente completato da Gakis, per la determinazione del rapporto 2-deossiadenosina deaminasi/adenosina deaminasi. Il test rileva indirettamente l'attività enzimatica misurando la liberazione di ammonio, derivante dall'idrolisi della adenosina o della 2-deossiadenosina da parte della quota enzimatica presente nel campione in esame, svelata dalla produzione di indofenolo blue.

Per l'esecuzione della metodica abbiamo utilizzato:

Soluzione di adenosina 20mmol/l e soluzione di 2-deossiadenosina 20mmol/l, in tampone fosfato (pH6.5)

Tampone fosfato (50 mmol, pH6.5)

Soluzione standard di ammonio solfato (75 $\mu\text{mol/l}$; NH_3 mval/l)

Soluzione fenolo/nitroprussiato (fenolo 106 mmol/l; nitroprussiato 0.17 mmol/l)

Soluzione alcalina di ipoclorito di sodio (NaOCl 11 mmol/l; NaOH 125 mmol/l).

Spesa stimata per singolo test, escluso operatore e costo spettrofotometro, di poco inferiore ad 1 euro.

Procedura

Centrifugare tutti i campioni a 2000 giri per 15 minuti ed utilizzare il surnatante.

Allestire 6 provette:

2 per le misure dello standard (bianco standard e standard)

2 per la determinazione dell'attività adenosina deaminasica del campione (bianco campione e campione)

2 per la determinazione dell'attività 2-deossiadenosina deaminasica (bianco campione e campione)

Trasferire nelle provette le seguenti soluzioni:

Soluzione	Campione1	Bianco campione1	Campione2	Bianco campione2	Standard	Bianco standard
Tampone fosfato					20µl	220µl
Adenosina	200µl	200µl				
2-deossi adenosina			200µl	200µl		
Soluzione standard					200µl	
Campione	20µl		20µl			
	A1	A2	B1	B2	C1	C2

Chiudere le provette, agitare al vortex per alcuni secondi e incubare a 37°C per 60 minuti. Terminata questa fase trasferire nelle provette i seguenti reagenti

Soluzione	Campione1	Bianco campione1	Campione2	Bianco campione2	Standard	Bianco Standard
fenolo/ nitropr.	600µl	600µl	600µl	600µl	600µl	600µl
Campione		20µl		20µl		
Ipoclorito Alcalino	600µl	600µl	600µl	600µl	600µl	600µl
	A1	A2	B1	B2	C1	C2

Chiudere le provette, agitare al vortex per alcuni secondi e incubare a 37°C per 60 minuti. Terminata questa fase trasferire nelle provette i seguenti reagenti

Mescolare al vortex per alcuni secondi ed incubare a temperatura ambiente per 30 minuti.

Infine leggere i risultati allo spettrofotometro, con lunghezza d'onda di 630 nm. L'azzeramento dello strumento deve essere eseguito contro acqua distillata.

Abbiamo ulteriormente perfezionato la metodica, consentendone una lettura spettrofotometrica automatizzata e su piastra a micropozzetti: ciò consente una maggiore precisione e rapidità, oltre alla possibilità di interpretare contemporaneamente un maggiore numero di campioni (fino a 18).

Interpretazione dei risultati

La conversione dei dati ottenuti allo spettrofotometro è ottenuta mediante la formula:

$A1-A2 \times 50 / C1-C2 =$ attività adenosina deaminasica espressa in UI/L;

$B1-B2 \times 50 / C1-C2 =$ attività 2-deossiadenosina deaminasica espressa in UI/L.

Valori di riferimento

In base ai dati riportati in letteratura abbiamo considerato positivi campioni di

liquido pleurico con attività ADA > 40 UI/L

liquor con attività ADA > 20 UI/L

Un rapporto 2deossiADA/ADA < 0.45 è stato considerato indice di produzione monocito-macrofagica dell'enzima, mentre un rapporto > 0.45 indice di produzione tissutale.

Risultati

Dei 124 campioni liquorali esaminati, i 6 provenienti da pazienti affetti da meningoencefalite tubercolare sono tutti risultati positivi (ADA >20 UI/L) e con rapporto 2deossiADA/ADA (Ratio) di tipo "sierico" (<0.45); altri 6 campioni liquorali sono risultati positivi tra quelli provenienti da pazienti affetti da meningoencefalite/meningite non tubercolare e 3 di questi ultimi con Ratio di tipo "tissutale" (>0.45).

Il nostro test ha dimostrato una sensibilità del 100% e una specificità dal 94% al 97% per la diagnosi di meningoencefalite tubercolare

Dei 128 campioni di liquido pleurico i 19 provenienti da pazienti con pleurite tubercolare sono tutti risultati positivi (ADA >40UI/L) e con Ratio <0.45; altri 26 campioni di liquido pleurico provenienti dai pazienti affetti da versamento pleurico non tubercolare sono risultati positivi: tra questi ultimi solo 5 hanno mostrato un Ratio <0.45

Il nostro test ha dimostrato una sensibilità del 100% e una specificità dal 76% al 96% per la diagnosi di pleurite tubercolare.

Discussione

La positività riscontrata nella totalità dei campioni liquorali e di liquido pleurico provenienti da pazienti con infezione tubercolare indica un'alta sensibilità (100%) della metodica da noi utilizzata. La presenza di positività anche in pazienti con meningite o pleurite di altra natura, dimostra una inferiore specificità del test riguardo ad un'etiologia tubercolare. In una patologia come la meningoencefalite tubercolare, che può rappresentare una vera e propria emergenza medica, con a volte importanti difficoltà diagnostiche, il dosaggio liquorale dell'adenosina deaminasi e dei suoi isoenzimi, potrebbe essere di notevole ausilio prima che le altre metodiche, che necessitano di alcuni giorni (PCR) o settimane (es. colturale), possano essere dirimenti. Quindi un test positivo in un forte sospetto clinico di infezione tubercolare, permetterebbe di instaurare una terapia precoce, in attesa dei risultati di indagini più specifiche che rimangono comunque indispensabili per una diagnosi di certezza.

In tre pazienti è stato possibile dosare l'ADA in campioni liquorali prelevati successivamente, in corso di follow-up terapeutico. Come già osservato in studi precedenti, anche in questo caso è stata riscontrata una progressiva riduzione dei valori dell'enzima in accordo con il miglioramento dei parametri clinici e di laboratorio.

Tra le patologie non tubercolari la positività della determinazione ADA su liquor del paziente con encefalite erpetica rispecchierebbe quanto già detto da altri autori, riguardo ad un innalzamento dell'enzima in tale patologia(20).

Non trova invece conferma in letteratura la positività per ADA tipo sierico riscontrata nel liquor del paziente con sindrome di Guillan-Barré. Tale riscontro casuale potrebbe essere spunto per ulteriori approfondimenti sia a fini diagnostici che di studio dell'immunopatologia della sindrome. La diagnosi di sindrome di Guillan-Barré era comunque stata posta in base ad esame obiettivo neurologico e non si era giunti a diagnosi definitiva, con successivo decesso del paziente trasferito presso altra struttura ospedaliera senza che fosse possibile eseguire un accertamento autoptico. In questo caso l'aumento dell'attività ADA nel liquor del paziente poteva essere spia di patologia di tutt'altra origine e suscettibile di terapia specifica quanto mai urgente.

L'alto valore di adenosina deaminasi, con rapporto $2deossiADA/ADA > 0.45$, ritrovato nel liquido pleurico sia del paziente con linfoma pleurico che della paziente con carcinoma mammario, correla con una produzione tissutale dell'enzima. In questi casi il test consente un orientamento nella diagnosi differenziale tra malattia infettiva e neoplastica.

Conclusioni

Con questa nostra esperienza abbiamo rivalutato l'utilità della determinazione dell'attività adenosina deaminasica per la diagnosi di tubercolosi extrapolmonare pleurica o meningea. La metodica da noi utilizzata era stata già ampiamente studiata e applicata nel nostro Istituto da Prof. C. Gakis.

Il test ha dimostrato un'elevata sensibilità nella diagnosi di infezioni da agenti intracellulari e un risultato negativo permetterebbe di escludere tale eventualità. Al contrario in presenza di dati clinici e laboratoristici suggestivi, la sua positività può essere di utile ausilio per la diagnosi precoce di tubercolosi.

La rapidità della metodica permette di disporre dei risultati già due ore dopo il prelievo del campione. Tali risultati devono essere sempre confermati da altre metodiche più specifiche, che richiedono però tempi di esecuzione più lunghi.

La possibilità di differenziare la produzione sierica dell'enzima da quella tissutale, tramite il rapporto 2deossi ADA/ADA, permette una diagnosi differenziale tra patologia infettiva e neoplastica.

Altri vantaggi del test sono la facilità di esecuzione, i costi ridotti e la possibilità di effettuarlo su campioni biologici di varia natura. Per le sue peculiarità il test, debitamente semplificato, potrebbe

essere di grande aiuto al medico che operi in paesi a basso tenore economico: in questi paesi è massima l'incidenza di patologia tubercolare e allo stesso tempo sono minime le risorse diagnostiche, spesso limitate ai parametri clinici e se disponibile ad una diagnosi microscopica (molto poco sensibile).

Una valutazione più approfondita di adenosina deaminasi in corso di malattie infettive e non infettive (autoimmuni e neoplastiche) potrebbe fornire dati aggiuntivi circa il ruolo dell'enzima nella risposta immunitaria cellulo-mediata.

Bibliografia

- 1) C.Gakis, M.A. Piras et Al.. Behaviour of serum 2deoxy adenosine deaminase ratio in infectious diseases and haemopoietic malignancies. *Pathology* 1981, 9:518-519
- 2) C. Gakis, M. A. Piras, G. Romani. Unusual biochemical pattern of serum adenosine deaminase activity in acute lymphoblastic leukemia. *Haematologica* 1982, 67:199-200
- 3) L.F. Thompson, J.C. Vaughn et Al.. Mechanisms of apoptosis in developing thymocytes as revealed by adenosine deaminase-deficient fetal thymic organ culture. *Biochem Pharmacol.* 2003 oct 15; 66(8):1595-9
- 4) A. Aiuti. *Advances in gene therapy for ADA-deficient SCID.* *Curr Opin Mol Ther.* 2002 Oct; 4:515-22
- 5) Y. Yoneyama et Al. Serum adenosine deaminase activity and its isoenzyme pattern in women with normal pregnancies. *Arch Gynecol Obstet.* 2003 Feb;267:205-7
- 6) C. Gakis, M.A. Piras, F. Saba et Al. *Rapporto 2deossiadenosina/adenosine del siero nella diagnosi clinica.* *Boll Soc Ital Biol Sper.* 1981; LVII;18;1848-51
- 7) L.F.López-Còrtez, M. Cruz-Ruiz et Al. Adenosine Deaminase Activity in the CSF of Patients with aseptic meningitis : utility in the diagnosis of Tuberculous Meningitis or Neurobrucellosis. *Clinical Infectious Diseases* 1995; 20:525-30
- 8) M.D. Voigt et Al. Diagnostic value of ascites adenosine deaminase in tuberculous peritonitis. *The Lancet*, 1989 Apr. 8: 751-3

- 9) Z.Yang, D.Xiang, M.Fu. The test for anti-TB and adenosine deaminase in ascites for distinguishing between tuberculous ascites and carcinous ascites. *Sichuan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*. 2003 Apr;34:320-1
- 10) M. Goto et Al. Diagnostic value of adenosine deaminase in tuberculous pleural effusion: a meta-analysis. *Ann Clin Biochem*. 2003 Jul;40: 374-81
- 11) M. Tahhan, F. Ugurman, A. Gozu, B. Akkalyoncu, B.Samurkasoglu. *Tumour necrosis factor-alpha in comparison to adenosine deaminase in tuberculous pleuritis*. *Respiration*. 2003 May; 70:270-4
- 12) C. Gakis, M.A. Piras, F. Saba, G. Romani, M. Longinotti. Rapporto 2deossiadenosina/adenosine deaminasi nei versamenti pleurici e peritoneali. Significato diagnostico. *Bol Soc It Biol Sper*. 1981;18:1835-41
- 13) O. Kayacan, D. Karnak, M. Delibalta, S. Beder, L. Karaca, H. Tutkak. *Adenosine deaminase activity in BAL in Turkish patients with smear negative pulmonary tuberculosis*. *Respir Med*. 2002 Jul;96:536-41
- 14) JH. Lee, CW Lee, SG Lee, HS Yang et Al. Comparison of polimerase chain reaction with adenosine deaminase activity in pericardial fluid for the diagnosis of tuberculous pericarditis. *Am J Med*. 2002 Oct; 113:519-21
- 15) SA. Rokayan. Serum adenosine deaminase activity and its isoenzyme in patients treated for tuberculosis. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2003 Jan;13:11-4

- 16) R. Fernandez Alvarez et Al. Community-acquired pneumonia: serum adenosine deaminase activity in the aetiological diagnosis. *Med Clin (Barc.)*2002 Oct;119:481-4
- 17) C. Gakis, M.A. Piras, G. Romani, F. Saba, G. Mela, S. Bionda, D. Gallisai. *Significato immunologico dell'attività adenosina deaminasi nella Febbre Eruttiva Mediterranea*. *Bol Soc It Biol Sper.* 1981;18:1842-7
- 18) Y. Nakamachi, M. Koshiba et Al. Specific increase in enzymatic activity of adenosine deaminase 1 in rheumatoid synovial fibroblasts. *Arthritis Rheum.* 2003 Mar; 48:668-74
- 19) M.A. Piras et Al. Serum adenosine deaminase activity in multiple myeloma and Hodgkin's Disease. *IRCS Pathology* 1981;9:197-8
- 20) M Lopez-Gomez, MA Lopez-Ruz, J. Jmenez-Alonso. High levels of adenosine deaminase in a patient with Herpetic encephalitis and initial negative PCR results. *Clin Infect Dis.* 2003 Jul ;37:147-48

Adenosine deaminase in tubercular infection

Dott. Marco Cilliano

Istituto di Malattie Infettive-Università degli Studi di Sassari

Scuola di Dottorato di Ricerca in Scienze Biomediche-XXII ciclo

Indirizzo Patologie Infettive nel viaggiatore internazionale.

Abstract:

We valued the role of Adenosine Deaminase Activity(ADA) in pleural effusion fluid and in liquor samples for the diagnosis of tubercular infection.

In the last 25 years in Italy the TB has maintained a stable frequency. More cases are observed in risk and age category and frequently are observed multi or extensively drug resistant strains. This trend is due to HIV/AIDS patients and immigrant cases. The possibility to acquire TB by international travellers is demonstrated.

BK kills more than 1800000/year people in the world, the majority in African high HIV infected areas and in Asia.

In the last years an increment of extrapulmonary forms has been observed: CNS infection and pleuritis due to BK are predominant forms. The diagnosis in these cases is often difficult: a part of complex clinical features, sometimes with a rapid and dramatic progression, the laboratory tests could be negative or late.

We valued ADA detection as marker of tubercular infection.

We modified the first Giusti/Gakis colorimetric method.

We analyze 128 pleural fluid and 124 CSF samples. Our test demonstrate a Sensibility of 100% and a Sensibility between 82% and 97%.

The test is rapid (2 h), cheap (< 1 €) and easy to do.

A negative result virtually excludes the TB. The rapidity and sensibility are useful to start early a specific treatment.

We think that the ADA dosage could be used also in development countries where the diagnosis of extrapulmonary TB often has not any support by the laboratory.