



MD 1452 Z 2021.07.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **1452** (13) **Z**
(51) Int.Cl: *A61B 10/00* (2006.01)
G01N 21/33 (2006.01)
G01N 33/15 (2006.01)
C12Q 1/37 (2006.01)

**(12) BREVET DE INVENȚIE
DE SCURTĂ DURATĂ**

<p>(21) Nr. depozit: s 2020 0009 (22) Data depozit: 2020.02.13</p>	<p>(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2020.08.31, BOPI nr. 8/2020</p>
<p>(71) Solicitant: AGENȚIA NAȚIONALĂ PENTRU SĂNĂTATE PUBLICĂ A MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII, MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE AL REPUBLICII MOLDOVA, MD</p> <p>(72) Inventatori: PINZARU Iurie, MD; GUDUMAC Valentin, MD; TONU Tatiana, MD; STÎNCĂ Kristina, MD</p> <p>(73) Titular: AGENȚIA NAȚIONALĂ PENTRU SĂNĂTATE PUBLICĂ A MINISTERULUI SĂNĂTĂȚII, MUNCII ȘI PROTECȚIEI SOCIALE AL REPUBLICII MOLDOVA, MD</p>	

(54) Metodă de diagnostic al intoxicațiilor acute de etiologie chimică**(57) Rezumat:**

Invenția se referă la medicină, și anume la toxicologie și poate fi utilizată în diagnosticul intoxicațiilor acute de etiologie chimică.

Esența invenției constă în aceea că proba de sânge a pacienților cu intoxicație acută de etiologie chimică se prelucrează cu triton X-100, se agită la vortex, timp de 60 s, se adaugă soluție de tampon fosfat-citrat cu pH de 7,0...7,1, se centrifughează; se transferă 300 μ l de hemolizat în microplaca fotometrică, se măsoară absorbanta Abs₁ la lungimea de undă de 630 nm, se adaugă aceton-cianhidrină (concentrația finală de 7,5...15,0 μ M/L), se agită timp de 3 min într-un termostat agitator și se măsoară absorbanta Abs₂ la lungimea de undă de 630 nm, absorbanta Abs₃ la lungimea de undă de 620 nm, și absorbanta Abs₄ la

lungimea de undă de 650 nm. Se adaugă fericianură de potasiu (concentrația finală de 1,1...2,2 μ M/L), se agită timp de 3 min într-un termostat agitator și se măsoară absorbanta Abs₅ la lungimea de undă de 540 nm, apoi se determină concentrația de MetHb, Hb_{tot.} (fără SHb), HbO₂, SHb, Hb_{tot} în hemolizat, %MetHb/Hb_{tot}, %SHb/Hb_{tot}, și suma pigmentilor sangvini neactivi. În cazul în care cantitatea procentuală de methemoglobină raportată la cantitatea de Hb totală este mai mare de 1%, cantitatea procentuală de sulfhemoglobină raportată la cantitatea de Hb totală este mai mare de 0,4%, iar suma pigmentilor sangvini neactivi este mai mare de 20%, se diagnostichează prezența intoxicației acute de etiologie chimică.

Revendicări: 1

MD 1452 Z 2021.07.31

(54) Method for diagnosing acute poisonings of chemical etiology**(57) Abstract:**

1

The invention relates to medicine, in particular to toxicology and can be used for diagnosing acute poisonings of chemical etiology.

Summary of the invention consists in that a blood sample of patients with acute poisoning of chemical etiology is treated with Triton X-100, stirred by shaking, for 60 s, is added a solution of phosphate-citrate buffer with a pH of 7.0...7.1, is centrifuged; is transferred 300 μ l of hemolysate to a photometric microplate, is measured the Abs₁ absorption at a wavelength of 630 nm, is added acetone-cyanohydrin (final concentration 7.5...5.0 μ M/L), is stirred for 3 min in a shaker-thermostat and Abs₂ absorption is measured at a wavelength of 630 nm, Abs₃ absorption at a wavelength of 620 nm, Abs₄

2

absorption at a wavelength of 650 nm. Potassium ferricyanide is added (final concentration 1.1...2.2 μ M/L), is stirred for 3 min in a shaker-thermostat and Abs₅ absorbance is measured at a wavelength of 540 nm, after which is determined the concentration of MetHb, Hb_{tot(without SHb)}}, HbO₂, SHb, Hb_{tot} in the hemolysate, %MetHb/Hb_{tot}, %SHb/Hb_{tot}, and the sum of inactive blood pigments. In the case when the percentage of methemoglobin in relation to the total amount of Hb is more than 1%, the percentage of sulfohemoglobin in relation to the total amount of Hb is more than 0.4%, and the sum of inactive blood pigments is more than 20%, the presence of acute poisoning of chemical etiology is diagnosed.

Claims: 1

(54) Метод диагностики острых отравлений химической этиологии**(57) Реферат:**

1

Изобретение относится к медицине, в частности к токсикологии и может быть использовано для диагностики острых отравлений химической этиологии.

Сущность изобретения состоит в том, что образец крови пациентов с острым отравлением химической этиологии обрабатывают тритоном X-100, перемешивают встряхиванием, в течение 60 с, добавляют раствор фосфатно-цитратного буфера с pH 7,0...7,1, центрифугируют; переносят 300 мкл гемолизата в фотометрический микропланшет, измеряют поглощение Abs₁ при длине волны 630 нм, добавляют ацетон-циангидрин (конечная концентрация 7,5...5,0 мкМ/л), перемешивают в течение 3 мин в шейкер-термостате и измеряют поглощение Abs₂ при длине волны 630 нм, поглощение Abs₃ при длине волны 620 нм, поглощение Abs₄

2

при длине волны 650 нм. Добавляют феррицианид калия (конечная концентрация 1,1...2,2 мкМ/л), перемешивают в течение 3 мин в шейкер-термостате и измеряют поглощение Abs₅ при длине волны 540 нм, после чего определяют концентрацию MetHb, Hb_{tot(без SHb)}}, HbO₂, SHb, Hb_{tot} в гемолизате, %MetHb/Hb_{tot}, %SHb/Hb_{tot}, и сумму неактивных пигментов крови. В случае, когда процентное содержание метгемоглобина по отношению к общему количеству Hb более 1%, процентное содержание сульфогемоглобина по отношению к общему количеству Hb более 0,4%, а сумма неактивных пигментов крови более 20%, диагностируют наличие острого отравления химической этиологии.

П. формулы: 1

Descriere:**(Descrierea se publică în redacția solicitantului)**

5 Invenția se referă la medicină, și anume la toxicologie și poate fi utilizată în diagnosticul intoxicațiilor acute de etiologie chimică.

Utilizarea, păstrarea și comercializarea incorectă a produselor chimice, cum ar fi: produse de uz fitosanitar, fertilizanți, medicamente etc. poate provoca intoxicație acută de origine chimică accidentală sau intenționată. Pentru stabilirea diagnosticului clinic al intoxicațiilor sus-menționate este necesar de a efectua testul de laborator privind determinarea nivelului de methemoglobină, sulfhemoglobină, oxihemoglobină. Methemoglobina este produsul oxidării ionului feros (Fe^{2+}) al hemului la ionul feric (Fe^{3+}), incapabil de a lega și transporta oxigenul (O_2) în sânge. În corpul uman formarea methemoglobinei legată de oxidarea endogenă a fierului are loc în mod constant, principalul agent oxidant fiind însăși oxigenul (în funcție de presiunea parțială a acestuia). Nivelul fiziologic al methemoglobinei din sânge este, după diferiți autori, de la 0,52 până la 1% (Данилова, Л.А. Анализ крови, мочи и других биологических жидкостей в различные возрастные периоды. Спец. Лит, 2014, 111 с.; T. Hanscheid, T. Gresnigt, S. Lohr et al. Methaemoglobin and COHb in patients with malaria. Malaria J., vol. 13, No. 1, 2014, p. 285; K.F. Rechetzki, R. Henneberg, P.H.D. Silva, A. J. D. Nascimento. Reference values for methemoglobin concentrations in children. Rev. Brasil. Hematol. Hemoter., vol. 34, No. 1, 2012, p. 14-16).

Methemoglobinemia, creșterea anormală a concentrației sangvine de methemoglobină (metHb), este diagnosticată atunci când procentul de methemoglobină depășește 1% din hemoglobina totală. Se dezvoltă methemoglobinemia toxică de origine endogenă datorită producției afectate și absorbției în enterite (așa-numitele cianoză enterogenă). Mecanismul exact al dezvoltării methemoglobinemiei nu este cunoscut, dar poate include o producție endogenă crescută de nitriți (Герман С.В. Метгемоглобинемии: особенности патогенеза и клиники С.В. Герман. Клиническая медицина. 1999, Т. 77, № 4. с. 9-12, 23). Methemoglobinemia toxică de origine exogenă (acută și cronică) apare atunci când sunt expuși la agenți de oxidare, agenți chimici care conțin azot, nitrocompuși (nitriți și nitrați, inclusiv nitroglicerina, nitrofenolii, nitroanilina, anilina și derivații săi), agenți de oxidare (clorați, permanganati, haluri, chinone), unii coloranți (albastru de metilen etc.), medicamente (subnitrat de bismut, furadonină, novocaină, sulfanilamide, aspirină, fenotiazină, anestezice locale (în special articaină, benzocaină, prilocaină, lidocaină, precum și coloranți de anilină, metoclopramidă, rasburicază, clorați și bromate (Кушаковский М.С. Клинические формы повреждения гемоглобина (этиология, патогенез, спектрофотометрические и биохимические методы исследования, диагностика, лечение) Л. Медицина, 1968. 325 с.; Camp, N.E. Methemoglobinemia. J. Emerg. Nurs. 2007, vol. 33, p. 172-174). Odată ajunși în organism, formatorii de methemoglobină oxidează direct ionul feros (Fe^{2+}) al hemului sau sunt metabolizați cu formarea de produse care au această proprietate. Nitriții și nitrații sunt compuși care oxidează în mod direct hemoglobina și este un inductor puternic al methemoglobinemiei. Patologiile provocate de conținutul sporit de nitrați, reziduuri de pesticide și/sau alte substanțe chimice sunt răspândite în întreaga lume, cu preponderență în zonele vulnerabile, în special zonele cu sistemul de aprovizionare cu apă potabilă descentralizat (apă din fântâni), regiunile cu utilizarea în exces a produselor de uz fitosanitar și a fertilizanților etc. Pentru prima dată, în anul 1945 intoxicațiile cu nitrați au fost puse în evidență de către Hunter Comly în SUA. De fapt, anumite cercetări privind nivelul cantității de nitrați în organism s-au făcut încă din secolul al XIX-lea, însă, cu toate acestea, un bilanț concludent încă nu a fost elaborat. În anul 1861, cercetătorul Wilffins a descoperit că nitrații sunt prezenți în urină, chiar și atunci când din alimentație lipsesc cu desăvârșire azotații.

Substanțele cele mai poluante care depășesc nivelele admisibile în apa potabilă caracteristice pentru fântânile din Republica Moldova sunt: conținutul sporit de nitrați (CMA-50 mg/L), caracteristic pentru fântânile din întreaga țară, care este rezultatul neglijării de către populație a principiului de respectare a igienizării, depozitării dejectiilor animale, utilizării sporite a fertilizanților pe baza sărurilor de amoniu etc. Ponderea probelor de apă neconforme normelor sanitare după conținutul de nitrați a constituit în anul 2018 – 60%, după conținutul de fluor – 2,5%, conținutul de bor – 0,2% (Datele statistice al ANSP, 2019).

Nitriții intră în contact cu sângele uman și formează un produs chimic numit methemoglobină. Această substanță împiedică transportarea oxigenului, adică funcția

principală a sângelui, rezultatul acestui deficit poate duce până la lipsa de oxigen (hipoxie). Cel mai periculos este faptul că methemoglobina este foarte greu metabolizată de copiii mici, mai ales sub vârsta de 3 luni - din cauza lipsei mecanismelor de metabolizare a unor astfel de substanțe într-un organism tânăr.

5 Se cunoaște că, Republica Moldova este o țara preponderent agrară, care utilizează anual, în medie, câte 2,47 mii tone de pesticide, care poate duce frecvent la acumularea reziduurilor de pesticide și nitrați în produsele alimentare de origine vegetală, cu efecte negative asupra stării de sănătate a populației. Utilizarea pesticidelor rămâne una din cele mai importante procedee cu impact asupra sănătății publice, la care apelează producătorii agricoli (Hotărârea Guvernului nr. 567 din 16.07.2014 cu privire la aprobarea Programului național de monitorizare a reziduurilor de pesticide și a conținutului de nitrați în produsele alimentare de origine vegetală pentru anii 2015...2020 (Monitorul Oficial, 2014, nr. 209-216, art. 631); Iurie Pinzaru, Gheorghii Țurcanu, Raisa Sîrcu, Elena Jardan, Tatiana Manceva. Dezvoltarea toxicologiei experimentale în Republica Moldova, 2016, 144 p.).

15 Sunt cunoscute mai multe metode de laborator pentru diagnosticul intoxicațiilor acute de etiologie chimică. Cea mai răspândită este metoda de cromatografie gazoasă cu spectrometrie de masă care este utilă atât pentru separarea substanțelor volatile care pot fi găsite în lichide biologice și pentru a cuantifica concentrația de etanol în sânge. Prin analiza gaz-cromatografică (GC) se obține o separare a substanțelor volatile, fiind posibilă identificarea alcoolului etilic din sângele total. După trecerea printr-o coloană de separare, moleculele de etanol sunt recunoscute de un detector cu ionizare în flacără (FID) care produce un semnal electric (peak) proporțional cu cantitatea de analit. Metoda de dozare a alcoolemiei se realizează pe un gaz-cromatograf marca Konik cu dispozitiv head-space, coloană capilară cu lungimea de 30 de metri și diametrul de 0,53 mm, detector cu ionizare în flacără (FID), având ca gaz purtător azotul, iar gazele detectoare – hidrogenul și aerul comprimat. În cuva ce conține coloana capilară se menține o temperatură constantă de 30°C, temperatura detectorului este de 250°C, presiunea H₂ este de 4 psi, iar a azotului 10 psi. Proba de sange împreună cu standardul intern (în proporții egale) se preîncălzesc în head-space timp de 10 min la temperatura de 80°C. Selectivitatea metodei se atestă prin analizarea unui amestec multicomponent format din metanol, etanol și acetonă, cu evidențierea semnalelor individualizate la timpuri de retenție diferiți pentru fiecare analit. În vederea realizării curbei de calibrare se folosesc următoarele: sânge total prelevat de la pacientul cu suspjecție/intoxicație de etiologie chimică. Se verifică liniaritatea metodei, prin calcularea coeficientului de corelație. Ca standard intern se folosește n-propanol Riedel de Heien cu concentrația de 0,5‰ [1].

35 O altă metoda de stabilire a diagnosticului clinic de intoxicație acută de origine chimică este metoda spectrofotometrie CФ-4, CФ-4a sau spectrofotometrie de înregistrare CФ-2M, CФ-10, prin care se măsoară cantitatea de methemoglobina (metHb), denumită și hemoglobină (Hi). Principiul metodei constă în aceea că, Hi într-o soluție acidă, oferă o bandă de absorbție caracteristică la 630 nm. Cianura de hemoglobină (HiCN), în care Hi se transformă ușor, nu are o bandă de absorbție în locul desemnat al spectrului. Prin urmare, scăderea densității optice care apare în urma tratamentului hemolizantului de sange cu cianuri, este proporțională cu cantitatea de Hi din soluție. Pentru a calcula cantitatea relativă de Hi, și anume procentul din cantitatea totală de hemoglobină din sânge, este necesară o soluție de control al sângelui investigat cu un conținut de 100 % Hi. Într-o eprubetă de centrifugă cu aproximativ 10 mL de soluție fiziologică se introduc 0,2...0,3 mL de sânge. Se centrifughează. Eritrocitele se hemolizează în decurs de 30...60 min prin adăugarea a 6 mL de apă distilată, apoi la hemolizatul obținut se adaugă 4 mL soluție tampon fosfat 0,1 M cu pH 6,8. Hemolizatul obținut este centrifugat la 6000...8000 rpm, timp de 10...15 min sau la 3000 rpm, timp de 30 min. Hemolizatul transparent se scurge și se împarte în 2 porțiuni, care apoi sunt turnate în cuve cu o distanță între fețele de lucru de 1 cm a spectrofotometrului CФ-4 sau a unui dispozitiv similar. În una din cuve se va adăuga imediat o picătură de soluție de 5% sau 5 g sare uscată de K₃[Fe(CN₆)] (este convenabil să cântăriți pe cântar de torsione), iar conținutul se agită.

55 Astfel, primim proba №1 – hemolizatul inițial și №2 – hemolizatul în care hemoglobina a trecut în Hi. Mai departe, fiecare dintre aceste cuve se fotometrează de două ori, înainte și după adăugarea cianurii (substanța foarte toxică pentru organismul uman).

Hi întotdeauna se formează în eritrocite în timpul metabolismului ce are loc în acestea, totuși, se restabilește imediat în hemoglobină sub influența sistemului enzimatic al methemoglobinei reductazei. Drept urmare, numai urme de Hi sunt conținute în sângele normal

(mai puțin de 1% din hemoglobina prezentă în sânge). O cantitate crescută poate apărea în cazul când sunt expuși la diverși agenți de oxidare, în ordinea intoxicațiilor intenționate sau accidentale (nitriți, nitroanilină și alte substanțe chimice) [2].

5 Metoda indicată prezintă un șir de dezavantaje și anume: există mai multe surse de eroare; este mai puțin precisă și pentru realizare necesită o cantitate relativ mare de reagenți cu o toxicitate înaltă și o cantitate relativ mare de material biologic, procesul decurge într-un interval de timp îndelungat, metoda este destul de costisitoare. Un alt neajuns al metodei indicate constă în aceea că ea nu prevede elaborarea și selectarea condițiilor optimale de efectuare a metodei, care ar permite păstrarea intactă a probei până la efectuarea analizei, fapt ce influențează negativ asupra reproductibilității și preciziei metodei. Se utilizează substanța cianură, care este toxică, fapt ce se răsfrânge nefast asupra stării de sănătate a populației, în special a lucrătorilor medicali.

10 Problema pe care o rezolvă invenția constă în elaborarea unei metode de diagnostic, care ar permite selectarea condițiilor optimale de dozare a nivelului de methemoglobină, sulfhemoglobină, oxihemoglobină și a conținutului sumar de pigmenți sangvini neactivi în aceeași probă de sânge, colectarea unei cantități mici a materialului biologic din degetul pacientului (avantaj în cazul colectării sângelui de la copii), precum și simplificarea metodei prin reducerea timpului de efectuare a analizei, fapt ce permite de a mări precizia și reproductibilitatea metodei, productivitatea muncii, eficiența din punct de vedere economic, 15 utilizarea soluțiilor mai puțin toxice cu scop de îmbunătățire a condițiilor de muncă pentru a diagnostica intoxicația acută de etiologie chimică.

20 Esența invenției constă în aceea că metoda include colectarea probei de sânge în cantitate de 0,02 mL din degetul pacienților, care se prelucrează cu o soluție de 0,0125...0,025% de triton X-100, se agită la vortex, timp de 60 s și se adaugă 1,0 mL de soluție de 0,15 M tampon fosfat-citrat cu pH de 7,0...7,1 (diluția finală a hemolizatului obținut fiind de 1/100), după care se centrifughează la o rotație de 5000 rot./min, timp de 5...7 min cu sedimentarea stromei eritrocitelor, apoi se transferă 300 μL de hemolizat transparent în microplaca fotometrică cu 96 de godeuri și se măsoară absorbanta Abs₁ la lungimea de undă de 630 nm (absorbanta maximă a MetHb), după care se adaugă 5 μL de soluție de 0,47...0,94 mM/L acetonecianhidrină (concentrația finală de 7,5...15,0 μM/L) și se agită la o rotație de 700 rot./min într-un termostat agitator, timp de 3 min, apoi se măsoară absorbanta Abs₂ la lungimea de undă de 630 nm, în continuare se măsoară absorbanta Abs₃ la lungimea de undă de 620 nm și absorbanta Abs₄ la lungimea de undă de 650 nm, apoi se adaugă 5 μL de soluție de 68...135,7 mM/L fericianură de potasiu (K₃ [Fe (CN)₆]) (concentrația finală de 1,1...2,2 μM/L) și se agită 25 la o rotație de 700 rot./min într-un termostat agitator, timp de 3 min, după care se măsoară absorbanta Abs₅ la lungimea de undă de 540 nm, apoi se determină concentrația de methemoglobină în hemolizat (C_(mEq) MetHb), concentrația de hemoglobină totală în hemolizat fără SHb (C_(mEq) Hb_{tot.}(fără SHb)), concentrația de oxihemoglobină în hemolizat (C_(mEq) HbO₂), concentrația de sulfhemoglobină în hemolizat (C_(mEq) SHb), concentrația de hemoglobină totală în hemolizat (C_(mEq) Hb_{tot.}), cantitatea procentuală de methemoglobină raportată la cantitatea de Hb totală (%MetHb/CHb_{tot.}), cantitatea procentuală de sulfhemoglobină raportată la cantitatea de Hb totală (%SHb/CHb_{tot.}) și suma pigmentilor sangvini neactivi (Σ_{pig. sag. neac.}), conform formulelor:

$$\begin{aligned}
 & C_{(mEq)} \text{MetHb} = (\text{Abs}_1 - \text{Abs}_2) / 3,6; \\
 & C_{(mEq)} \text{Hb}_{tot.}(\text{fără SHb}) = \text{Abs}_5 / 11,0; \\
 & C_{(mEq)} \text{HbO}_2 = C_{(mEq)} \text{Hb}_{tot.}(\text{fără SHb}) - C_{(mEq)} \text{MetHb}; \\
 & C_{(mEq)} \text{SHb} = [(\text{Abs}_3 - \text{Abs}_4) - 0,14 \cdot C_{(mEq)} \text{HbO}_2 - 0,43 \cdot C_{(mEq)} \text{MetHb}] / 6,25; \\
 & C_{(mEq)} \text{Hb}_{tot.} = C_{(mEq)} \text{Hb}_{tot.}(\text{fără SHb}) + C_{(mEq)} \text{SHb}; \\
 & \% \text{MetHb} / C \text{Hb}_{tot.} = (C_{(mEq)} \text{MetHb} / C_{(mEq)} \text{Hb}_{tot.}) \times 100; \\
 & \% \text{SHb} / C \text{Hb}_{tot.} = (C_{(mEq)} \text{SHb} / C_{(mEq)} \text{Hb}_{tot.}) \times 100; \\
 & \Sigma_{\text{pig. sag. neac.}} = \% \text{MetHb} / \text{CHb}_{tot.} + \% \text{SHb} / \text{CHb}_{tot.},
 \end{aligned}$$

30 in cazul în care cantitatea procentuală de methemoglobină raportată la cantitatea de Hb totală este mai mare de 1%, cantitatea procentuală de sulfhemoglobină raportată la cantitatea de Hb totală este mai mare de 0,4%, iar suma pigmentilor sangvini neactivi este mai mare de 20%, se diagnostichează prezența intoxicației acute de etiologie chimică. 35

Rezultatul metodei constă în aceea că, ea permite determinarea într-o singură probă de sânge a concentrației de derivați ai hemoglobinei (oxihemoglobină, methemoglobină și sulfhemoglobină) pentru stabilirea diagnosticului de intoxicație acută de etiologie chimică în timp redus. De asemenea, datorită elaborării și selectării condițiilor optimale de realizare a

metodei propuse, ea permite mărirea preciziei și reproductibilității, productivității muncii și eficienței economice. În plus, metoda propusă necesită un timp mai redus pentru realizare, are o complexitate mai mică la etapa preanalitică. Un avantaj semnificativ al metodei propuse este cantitatea mult mai mică de biomaterial necesară pentru analiză, luată din degetul pacientului

5 ceea ce este, fără îndoială, un criteriu important în alegerea metodelor pentru determinarea nivelurilor derivaților hemoglobinei, atunci când se lucrează cu pacienți pediatrici.

Metoda se efectuează în modul următor: se efectuează colectarea probei de sânge în cantitate de 0,02 mL din degetul pacienților, care se prelucrează cu o soluție de 0,0125...0,025% de triton X-100, se agită la vortex, timp de 60 s și se adaugă 1,0 mL de soluție de 0,15 M tampon fosfat-citrat cu pH de 7,0...7,1 (diluția finală a hemolizatului obținut fiind de 1/100), după care se centrifughează la o rotație de 5000 rot./min, timp de 5...7 min cu sedimentarea stromei eritrocitelor, apoi se transferă 300 μL de hemolizat transparent în microplaca fotometrică cu 96 de godeuri și se măsoară absorbanta Abs₁ la lungimea de undă de 630 nm (absorbanta maximă a MetHb), după care se adaugă 5 μL de soluție de 0,47...0,94 mM/L aceton-cianhidrină (concentrația finală de 7,5...15,0 μM/L) și se agită la o rotație de 700 rot./min într-un termostat agitator, timp de 3 min, apoi se măsoară absorbanta Abs₂ la lungimea de undă de 630 nm, în continuare se măsoară absorbanta Abs₃ la lungimea de undă de 620 nm și absorbanta Abs₄ la lungimea de undă de 650 nm, apoi se adaugă 5 μL de soluție de 68...135,7 mM/L fericianură de potasiu (K₃ [Fe (CN)₆]) (concentrația finală de 1,1...2,2 μM/L) și se agită la o rotație de 700 rot./min într-un termostat agitator, timp de 3 min, după care se măsoară absorbanta Abs₅ la lungimea de undă de 540 nm, apoi se determină concentrația de methemoglobină în hemolizat (C_(mEq) MetHb), concentrația de hemoglobină totală în hemolizat fără SHb (C_(mEq) Hb_{tot.(fără SHb)}), concentrația de oxihemoglobină în hemolizat (C_(mEq) HbO₂), concentrația de sulfhemoglobină în hemolizat (C_(mEq) SHb), concentrația de hemoglobină totală în hemolizat (C_(mEq) Hb_{tot.}), cantitatea procentuală de methemoglobină raportată la cantitatea de Hb totală (%MetHb/CHb_{tot.}), cantitatea procentuală de sulfhemoglobină raportată la cantitatea de Hb totală (%SHb/CHb_{tot.}) și suma pigmentilor sangvini neactivi (Σ_{pig.sag.neac.}), conform formulelor:

$$\begin{aligned}
 C_{(mEq)} \text{ MetHb} &= (Abs_1 - Abs_2) / 3,6; \\
 C_{(mEq)} \text{ Hb}_{tot.(fără SHb)} &= Abs_5 / 11,0; \\
 C_{(mEq)} \text{ HbO}_2 &= C_{(mEq)} \text{ Hb}_{tot.(fără SHb)} - C_{(mEq)} \text{ MetHb}; \\
 C_{(mEq)} \text{ SHb} &= [(Abs_3 - Abs_4) - 0,14 \cdot C_{(mEq)} \text{ HbO}_2 - 0,43 \cdot C_{(mEq)} \text{ MetHb}] / 6,25; \\
 C_{(mEq)} \text{ Hb}_{tot.} &= C_{(mEq)} \text{ Hb}_{tot.(fără SHb)} + C_{(mEq)} \text{ SHb}; \\
 \% \text{ MetHb} / C \text{ Hb}_{tot.} &= (C_{(mEq)} \text{ MetHb} / C_{(mEq)} \text{ Hb}_{tot.}) \cdot 100; \\
 \% \text{ SHb} / C \text{ Hb}_{tot.} &= (C_{(mEq)} \text{ SHb} / C_{(mEq)} \text{ Hb}_{tot.}) \cdot 100; \\
 \Sigma_{\text{pig.sag.neac.}} &= \% \text{ MetHb} / C \text{ Hb}_{tot.} + \% \text{ SHb} / C \text{ Hb}_{tot.},
 \end{aligned}$$

in cazul in care cantitatea procentuală de methemoglobină raportată la cantitatea de Hb totală este mai mare de 1%, cantitatea procentuală de sulfhemoglobină raportată la cantitatea de Hb totală este mai mare de 0,4%, iar suma pigmentilor sangvini neactivi este mai mare de 20%, se diagnostichează prezența intoxicației acute de etiologie chimică.

- 11,0 este coeficientul milimolar de extincție (absorbivitatea molară (ε) al Hb_{tot} în mM/cm⁻¹/l⁻¹);

- 3,6 este coeficientul milimolar de extincție (absorbivitatea molară (ε) al MetHb în mM/cm⁻¹/l⁻¹);

- 6,25 este coeficientul milimolar de extincție (absorbivitatea molară (ε) al SHb în mM/cm⁻¹/l⁻¹).

Exemplu

Se ia o cantitate de 0,02 mL de sânge din degetul pacienților cu suspiecții și/sau intoxicații acute de etiologie chimică și se amestecă cu 0,98 mL de soluție de 0,0125... 0,025% de triton X-100, apoi se agită la vortex 60 s și se adaugă 1,0 mL de soluție de 0,15 M tampon fosfat-citrat cu pH 7,1 (diluția finală a hemolizatului obținut constituie 1/100), după care se centrifughează la 5000 rot./min 7 min, pentru sedimentarea stromei eritrocitelor. În continuare se transferă 300 μL de hemolizat transparent în microplaca fotometrică cu 96 godeuri și se măsoară absorbanta Abs₁ la 630 nm (maximumul absorbantei MetHb). Ulterior se adaugă 5 μL soluție de 0,94 mM/L aceton-cianhidrină (concentrația finală 15,0 μM/L) și se amestecă la 700 rot./min într-un termostat agitator, timp de 3 min după ce se măsoară repetat absorbanta Abs₂ la 630 nm. În continuare se măsoară absorbanta Abs₃ la 620 nm și Abs₄ la 650 nm. Apoi se adaugă 5 μL soluție de 135,7 mM/L fericianură de potasiu (K₃ [Fe (CN)₆]) (concentrația

finală 2,2 $\mu\text{M/L}$) și se agită 3 min la 700 rot./min într-un termostat agitator, după care se măsoară absorbanta Abs_5 la 540 nm.

La măsurarea absorbantei s-a obținut:

Abs_1 (630nm)	-	0,172
Abs_2 (630 nm)	-	0,070
Abs_3 (620 nm)	-	0,165
Abs_4 (650 nm)	-	0,103
Abs_5 (540 nm)	-	0,851

- 5 1. Concentrația (mEq) de MetHb in hemolizat ($C_{(\text{mEq})} \text{MetHb}$) = $(\text{Abs}_1 - \text{Abs}_2) / 3,6 = (0,172 - 0,070) / 3,6 = 0,0283$;
2. Concentrația (mEq) de Hb totală (fără SHb) ($C_{(\text{mEq})} \text{Hb}_{\text{tot. (fără SHb)}}$) in hemolizat = $\text{Abs}_5 / 11,0 = 0,851 / 11,0 = 0,0774$;
- 10 3. Concentrația (mEq) de oxihemoglobină ($C_{(\text{mEq})} \text{HbO}_2$) in hemolizat = $[C_{(\text{mEq})} \text{Hb}_{\text{tot. (fără SHb)}} - C_{(\text{mEq})} \text{MetHb}] = 0,0774 - 0,0283 = 0,0491$;
4. Concentrația (mEq) de sulfhemoglobină ($C_{(\text{mEq})} \text{SHb}$) in hemolizat: = $[(\text{Abs}_3 - \text{Abs}_4) - (0,14 \cdot C_{(\text{mEq})} \text{HbO}_2) - (0,43 \cdot C_{(\text{mEq})} \text{MetHb})] / 6,25 = [(0,165 - 0,103) - (0,14 \cdot 0,0491) - (0,43 \cdot 0,0283)] / 6,25 = 0,00687$;
- 15 5. Concentrația (mEq) de Hb totală ($C_{(\text{mEq})} \text{Hb}_{\text{tot}}$) in hemolizat: = $C_{(\text{mEq})} \text{Hb}_{\text{tot. (fără SHb)}} + C_{(\text{mEq})} \text{SHb} = 0,0774 + 0,00687 = 0,0843$;
6. Procentul de methemoglobină raportat la cantitatea de Hb totală: = $(C_{(\text{mEq})} \text{MetHb} / C_{(\text{mEq})} \text{Hb}_{\text{tot}}) \cdot 100 = 0,0283 / 0,0843 = 33,6\%$;
7. Procentul de sulfhemoglobină (%SHb) raportat la cantitatea de Hb totală $C_{(\text{mEq})} \text{SHb} / C_{(\text{mEq})} \text{Hb}_{\text{tot}} \cdot 100 = (0,00687 / 0,0843) \cdot 100 = 8,1\%$;
- 20 8. Suma pigmentilor sangvini neactivi = Procentul de metHb raportat la cantitatea de Hb totală + Procentul de SHb raportat la cantitatea de Hb totală = $33,6 + 8,1\% = 41,7\%$.

În cazul dat avem o hipermethemoglobinemie și o hipersulfhemoglobinemie pronunțată, însoțită de o hipoxie majoră, suma pigmentilor sangvini neactivi constituind 42%, fapt ce confirmă prezența intoxicației acute de etiologie chimică.

- 25 Analizele au fost efectuate în laboratorul de biochimie (în număr de 300 de analize), iar rezultatele obținute au permis de a argumenta efectul pozitiv și avantajul metodei propuse față de cea mai apropiată soluție. La folosirea metodei descrise se reduce cantitatea de reagenți relativi toxici folosiți (aceton-cianhidrină, $\text{K}_3 [\text{Fe}(\text{CN})_6]$), se reduc cheltuielile de timp la realizarea metodei, se mărește precizia și reproductibilitatea metodei în comparație cu
- 30 prototipul. Aceasta permite de a depista mai precis tulburările nivelului derivaților hemoglobinei în caz de intoxicații de etiologie chimică, sau de altă natură, se reduce probabilitatea apariției proceselor patologice legate de intoxicația cronică cu reactivi toxici, se reduce acțiunea nocivă a reagenților toxici asupra mediului ambiant, crește productivitatea muncii cu un efect economic apreciabil. Un avantaj important al metodei propuse este
- 35 posibilitatea realizării metodei la pacienți pediatrici, datorită reducerii cantității de biomaterial necesar pentru analiză.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Harald Jung, Adriana Jung, Laszlo Hecser, Daniela Lucia Muntean. Determinarea alcoolemiei prin metoda gaz-cromatografică: validarea și necesitatea stabilirii pragului de cuantificare. Romanian Society of Legal Medicine, nr 16 (1), 2008, p. 27-30
2. Биохимические методы исследования в клинике (Справочник)/ Под ред. академика, проф. А.А. Покровского. Изд. Медицина, М., 1969, с. 373 - 379

(57) Revendicări:

Metodă de diagnostic al intoxicațiilor acute de etiologie chimică, care include colectarea probei de sange în cantitate de 0,02 mL din degetul pacienților, care se prelucrează cu o soluție de 0,0125...0,025% de triton X-100, se agită la vortex, timp de 60 s și se adaugă 1,0 mL de soluție de 0,15 M tampon fosfat-citrat cu pH de 7,0...7,1 (diluția finală a hemolizatului obținut fiind de 1/100), după care se centrifughează la o rotație de 5000 rot./min, timp de 5...7 min cu sedimentarea stromei eritrocitelor, apoi se transferă 300 μL de hemolizat transparent în microplaca fotometrică cu 96 de godeuri și se măsoară absorbanta Abs₁ la lungimea de undă de 630 nm (absorbanta maximă a MetHb), după care se adaugă 5 μL de soluție de 0,47...0,94 mM/L aceton-cianhidrină (concentrația finală de 7,5...15,0 μM/l) și se agită la o rotație de 700 rot./min într-un termostat agitator, timp de 3 min, apoi se măsoară absorbanta Abs₂ la lungimea de undă de 630 nm, în continuare se măsoară absorbanta Abs₃ la lungimea de undă de 620 nm și absorbanta Abs₄ la lungimea de undă de 650 nm, apoi se adaugă 5 μl de soluție de 68...135,7 mM/L fericianură de potasiu (K₃ [Fe (CN)₆]) (concentrația finală de 1,1...2,2 μM/L) și se agită la o rotație de 700 rot./min într-un termostat agitator, timp de 3 min, după care se măsoară absorbanta Abs₅ la lungimea de undă de 540 nm, apoi se determină concentrația de methemoglobină în hemolizat (C_(mEq) MetHb), concentrația de hemoglobină totală în hemolizat fără SHb (C_(mEq) Hb_{tot.(fără SHb)}), concentrația de oxihemoglobină în hemolizat (C_(mEq) HbO₂), concentrația de sulfhemoglobină în hemolizat (C_(mEq) SHb), concentrația de hemoglobină totală în hemolizat (C_(mEq) Hb_{tot}), cantitatea procentuală de methemoglobină raportată la cantitatea de Hb totală (%MetHb/CHb_{tot}), cantitatea procentuală de sulfhemoglobină raportată la cantitatea de Hb totală (%SHb/CHb_{tot}) și suma pigmentilor sangvini neactivi (Σ_{pig.sag.neac.}), conform formulelor:

$$C_{(mEq)} \text{ MetHb} = (Abs_1 - Abs_2) / 3,6;$$

$$C_{(mEq)} \text{ Hb}_{tot.(fără SHb)} = Abs_5 / 11,0;$$

$$C_{(mEq)} \text{ HbO}_2 = C_{(mEq)} \text{ Hb}_{tot.(fără SHb)} - C_{(mEq)} \text{ MetHb};$$

$$C_{(mEq)} \text{ SHb} = [(Abs_3 - Abs_4) - 0,14 \cdot C_{(mEq)} \text{ HbO}_2 - 0,43 \cdot C_{(mEq)} \text{ MetHb}] / 6,25;$$

$$C_{(mEq)} \text{ Hb}_{tot.} = C_{(mEq)} \text{ Hb}_{tot.(fără SHb)} + C_{(mEq)} \text{ SHb};$$

$$\% \text{ MetHb} / C \text{ Hb}_{tot.} = (C_{(mEq)} \text{ MetHb} / C_{(mEq)} \text{ Hb}_{tot.}) \times 100;$$

$$\% \text{ SHb} / C \text{ Hb}_{tot.} = (C_{(mEq)} \text{ SHb} / C_{(mEq)} \text{ Hb}_{tot.}) \times 100;$$

$$\Sigma_{\text{pig. sag. neac.}} = \% \text{ MetHb} / C \text{ Hb}_{tot.} + \% \text{ SHb} / C \text{ Hb}_{tot.},$$

în cazul în care cantitatea procentuală de methemoglobină raportată la cantitatea de Hb totală este mai mare de 1%, cantitatea procentuală de sulfhemoglobină raportată la cantitatea de Hb totală este mai mare de 0,4%, iar suma pigmentilor sangvini neactivi este mai mare de 20%, se diagnostichează prezența intoxicației acute de etiologie chimică.