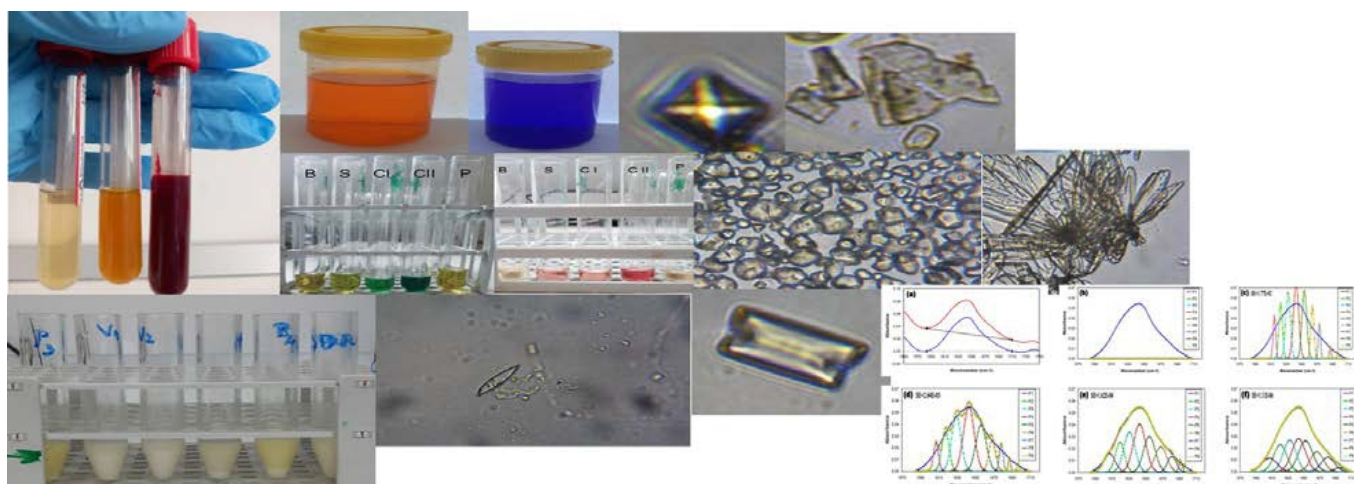


Anca MIHALY COZMUȚA

Leonard MIHALY COZMUȚA

METODE FIZICO-CHIMICE DE ANALIZĂ A PROBELOR BIOLOGICE

Îndrumător de lucrări practice



U.T.PRESS
Cluj-Napoca, 2025
ISBN 978-606-737-761-3

Anca MIHALY COZMUȚA

Leonard MIHALY COZMUȚA

**METODE FIZICO-CHIMICE
DE ANALIZĂ
A PROBELOR BIOLOGICE**

Îndrumător de lucrări practice



U.T. PRESS

Cluj-Napoca, 2025

ISBN 978-606-737-761-3



Editura U.T.PRESS
Str. Observatorului nr. 34
400775 Cluj-Napoca
Tel.: 0264-401.999
e-mail: utpress@biblio.utcluj.ro
www.utcluj.ro/editura

Recenzia: Prof.dr. Anca Peter
Conf.dr. Camelia Nicula

Pregătire format electronic on-line: Gabriela Groza

Copyright © 2025 Editura U.T.PRESS
Reproducerea integrală sau parțială a textului sau ilustrațiilor din această carte este posibilă numai cu acordul prealabil scris al editurii U.T.PRESS.

ISBN 978-606-737-761-3

CUPRINS

1. CENTRIFUGAREA.....	11
Centrifugarea simplă a probelor de sânge.....	11
Centrifugarea cu gradient de densitate a probelor de sânge.....	15
Centrifugarea urinii.....	17
2. ANALIZA SALIVEI.....	18
Aspecte generale.....	18
Analiza fizică a salivei.....	19
Analiza chimică a salivei.....	21
Reacții de identificare a componentelor din salivă.....	24
3. ANALIZA URINII.....	27
Tipuri de probe de urină.....	27
Analiza urinii.....	29
A. Sumarul de urină.....	30
Analiza fizică a urinii.....	30
Volumul urinar.....	30
Densitatea urinii.....	30
Culoarea urinii.....	31
Transparența urinii.....	33
Mirosul urinii.....	33
Aciditatea titrabilă a urinii.....	33
pH-ului urinii.....	34
Analiza sedimentului urinar.....	35
B. Reacții de identificare a componentelor patologici din urină.....	48
Identificarea proteinelor în urină (proteinuria).....	48
Identificarea puroiului în urină (piuria)- Metoda Donné.....	50
Identificarea glucidelor urinare (glicozuria).....	51
Identificarea corpurilor cetonice în urină (cetonurie).....	55
Identificare pigmentilor biliari în urină.....	56
Identificarea urobilinogenului și stercobilinogenului.....	58
Testul de spumare.....	59
Identificarea acizilor biliari din urină (colalurie).....	59
Identificarea sângelui în urină (hematuria și hemoglobinuria).....	60
C. Analiza cantitativă a componentelor urinari (biochimie).....	62
Determinarea spectrofotometrică a nitriților din urină.....	62
Dozarea acidului uric urinar.....	64
Dozarea iodometrică a acidului uric urinar.....	64
Dozarea enzimatică a acidului uric urinar.....	65
Dozarea acidului uric urinar cu spectrofotometrul BioSystems BTS-350.....	67
Dozarea ureei.....	69
Dozarea ureei - Metoda Berthelot.....	69
Dozarea ureei/BUN cu spectrofotometrul BioSystems BTS-350.....	71
Dozarea creatinei și creatininei urinare.....	74
Dozarea creatinei și creatininei urinare - Metoda Jaffe.....	74
Dozarea creatininei urinare folosind spectrofotometrul	

BioSystems BTS-350.....	76
Clearance creatininic.....	78
Dozarea elementelor minerale în urină (Ionograma urinii).....	79
Dozarea clorului urinar - Metoda Mohr.....	79
Dozarea complexometrică a Ca urinar.....	81
Dozarea elementelor minerale din urină prin spectrometrie de absorbție atomică.....	82
Dozarea iodometrică a acidului ascorbic din urină - Metoda Palladins.....	84
Dozarea proteinelor urinare folosind spectrofotometrul BioSystems BTS-350..	85
Identificarea rapidă a compușilor din urină cu ajutorul testelor rapide	
Utilizarea analizorului automat URIPATH Reader 100 PLUS (Urine Strips Reader) pentru analiza rapidă a urinii.....	88
Folosirea strip-urilor cu comparare vizuală pentru analiza urinii.....	89
Limite și interferențe la analiza urinii.....	90
4. ANALIZA SÂNGELUI.....	93
Recoltarea, conservarea și centrifugarea sângelui.....	93
Reacții de identificare a componentelor din sânge.....	94
Identificarea formaldehidei în sânge.....	95
Identificarea alcoolului metilic în sânge.....	95
Identificarea hormonilor tiroidieni.....	96
Identificarea insulinei prin metoda biuretului – Metoda Piotrowski.....	96
Reacții de dozare a componentelor din sânge (BIOCHIMIE).....	97
Izolarea și dozarea alcoolului în sânge.....	97
Izolarea alcoolului din sânge.....	97
Dozarea alcoolului din sânge.....	98
Metoda sulfocromică Nicloux.....	98
Metoda nitrocromatică Cordebard.....	99
Dozarea colesterolului din sânge.....	101
Dozarea colesterolului total - Metoda cu acid sulfosalicilic.....	102
Dozarea colesterolului total și liber - Metoda cu digitonină.....	103
Determinare colesterolului liber și esterificat din serul sanguin cu spectrofotometrul BioSystems BTS-350-Metoda enzimatică.....	105
Determinare HDL serul sanguin cu spectrofotometrul BioSystems BTS-350.....	107
Dozarea glucozei din sânge (glicemia).....	110
Dozarea glucozei din sânge - Metoda enzimatică.....	111
Testul de toleranță la glucoză (TTGO).....	113
Dozarea glucozei serice-Metoda titrimetrică Hagedorn-Jensen.....	116
Determinare glucozei serice folosind spectrofotometrul BioSystems BTS-350.....	119
Determinarea activității catalazei sanguine–Metoda Bach-Zubkova.....	121
Dozarea hemoglobinei din sânge sub formă de oxihemoglobină.....	123
Identificarea pigmentilor sanguini - Metoda spectrofotometrică.....	124
Determinarea activității transaminazelor -Metoda colorimetrică cu 2,4-dinitrofenilhidrazină.....	125
Determinarea activității fosfatazei alcaline.....	129
Determinarea activității fosfatazei alcaline - Metoda Bodansky.....	129

Determinarea activității fosfatazei alcaline folosind spectrofotometrul BioSystems BTS-350.....	131
Dozare acid lactic seric - Metoda spectrofotometrică/enzimatică.....	134
Dozarea ureei serice.....	135
Dozarea ureei serice - Metoda spectrofotometrică/enzimatică.....	136
Dozarea ureei serice folosind spectrofotometrul BioSystems BTS-350.....	137
Dozarea acidului uric seric.....	137
Dozarea acidului uric seric - Metoda spectrofotometrică/enzimatică.....	139
Dozarea albuminei serice folosind spectrofotometrul BioSystems BTS-350.....	141
Dozarea proteinelor totale serice.....	141
Dozarea proteinelor totale serice - Metoda biuretului.....	143
Dozarea proteinelor totale serice folosind spectrofotometrul BioSystems BTS-350 (BIURET).....	145
Determinarea factorului reumatoid (RF) folosind spectrofotometrul BioSystems BTS- 350.....	147
Dozarea creatininei serice - Metoda Folin Dozarea bilirubinei serice totale și directe (bilirubinemia).....	149
Dozarea bilirubinei serice - Diazoreacția van den Bergh.....	149
Dozarea bilirubinei totale și directe folosind spectrofotometrul BioSystems BTS-350.....	151
Dozarea proteinei-C reactive folosind spectrofotometrul BioSystems BTS-350.....	155
Dozarea trigliceridelor folosind spectrofotometrul BioSystems BTS-350.....	157
Dozarea acizilor biliari totali folosind spectrofotometrul BioSystems BTS-350.....	159
Determinarea capacității totale de legare a fierului folosind spectrofotometrul BioSystems BTS-350.....	162
Dozarea elementelor minerale din sânge (ionograma).....	166
Determinarea Ca din serul sanguin - Metoda complexonometrică.....	168
Dozarea fierului seric - Metoda Heilmeyer modificată.....	170
Dozarea clorului seric.....	171
Dozarea fosfatului anorganic seric - Metoda Briggs cu deproteinizare.....	173
Determinarea creatinkinazei folosind spectrofotometrul BioSystems.....	175
Dozarea Imunoglobulinei G (Ig G).....	177
5. ANALIZA SUCULUI GASTRIC.....	180
Aspecte generale.....	180
Analiza fizică a sucului gastric.....	181
Determinarea acidității sucului gastric.....	181
Testarea prezenței constituenților anormali în sucul gastric.....	182
6. ANALIZA LICHIDULUI CEFALORAHIDIAN (cerebrospinal, LCR).....	183
Aspecte generale.....	183
Analiza fizică a LCR.....	183
Analiza chimică a LCR.....	184
Analiza glucozei în LCR (glicocorahia).....	184
7. ANALIZA MATERIILOR FECALE.....	185
Aspecte generale.....	185
Identificarea sângelui din scaun – Metoda Gregersen.....	185
Evidențierea glucidelor, lipidelor și proteinelor din scaun.....	186
8. ANALIZA UNGHIILOR ȘI PĂRULUI.....	188

Aspecte generale.....	188
Studiul modificărilor structurale ale unghiilor folosind tehnica FTIR.....	188
Specierea elementelor minerale în unghii și păr.....	190
9. ANALIZA CALCULILOR.....	193
Aspecte generale.....	193
Reacții de identificare a componentelor din calculii urinari.....	194
Aplicarea metodei FTIR în caracterizarea calculilor biliari.....	195
10. LICHIDUL SINOVIAL.....	198
Aspecte generale.....	198
Caracterizarea fizică.....	198
Analiza chimică.....	200
Analiza microbiologică.....	200
Analiza microscopică.....	201
11. DETERMINAREA BIODISPONIBILITĂȚII NUTRIENȚILOR DIN ALIMENTE PRIN DIGESTIE <i>IN VITRO</i>. STUDIU DE CAZ: DETERMINAREA BIODISPONIBILITĂȚII ELEMENTELOR MINERALE.....	204
12. ELECTROFOREZA.....	210
Aspecte generale.....	210
Electroforeza pe hârtie.....	210
Electroforeza pe hârtie a proteinelor serice.....	210
Electroforeza pe gel de agaroză.....	214
Electroforeza proteinelor serice pe gel de agaroză.....	214
Electroforeza ADN pe gel de agaroză.....	218
Electroforeza lipoproteinelor serice pe gel de agaroză.....	225
Electroforeza hemoglobinei pe gel de agaroză.....	229
Electroforeza pe gel de poliacrilamidă SDS-PAGE.....	233
Electroforeza proteinelor glutenice.....	243
Dozarea conținutului proteic prin metoda Bradford.....	239
Micrometoda Bradford de dozare a proteinelor.....	244
13. DIALIZA.....	246
14. ANALIZE DE HEMOSTAZIE (COAGULARE).....	249
Aspecte generale.....	249
Determinarea Timpului de Protrombină (PT, timp de coagulare, timp quick TQ).....	250
Determinarea Timpului de Trombină (TT).....	254
Determinarea Timpului de Tromboplastină Parțial Activată (APTT); Timp de Cefalină Activator (TCA).....	256
Determinarea Fibrinogenului (FIB) – Metoda Clauss.....	259
15. ELEMENTE DE HEMATOLOGIE.....	263
Clasificarea și măsurarea celulelor sanguine folosind Analizorul Automat de Hematologie – Rayto - RT-7600.....	263
ANEXE.....	269
Anexa 3.1. Exemplificare de folosire a spectrofotometrului BioSystems BTS-350 pentru analiza conținutului de acid uric urinar.....	269
Anexa 3.2. Limite componente Urină de control biochimică-Nivel I (normal).....	271
Anexa 3.3. Limite componente Urină de control biochimică -Nivel II (patologic).....	272
Anexa 3.4. Limite componente Ser de Control Biochimic -Nivel I (normal).....	273
Anexa 3.5. Limite componente Ser de Control Biochimic -Nivel II (patologic).....	275

Anexa 15.1. Factorul ISI și construcția curbei de calibrare pentru determinarea Timpului de Protrombină (PT).....	277
BIBLIOGRAFIE.....	278

1. CENTRIFUGAREA

Centrifugarea simplă a probelor de sânge

Centrifugarea sângelui are ca scop separarea componentelor sale cu scop de diagnostic, terapeutic sau de cercetare. Metoda cea mai des folosită pentru separare este **centrifugarea simplă**. În urma centrifugării se separă trei straturi, cu densități, compoziții și culori diferite (Figura 1.1, Figura 1.2), care pot fi izolate cu ușurință.

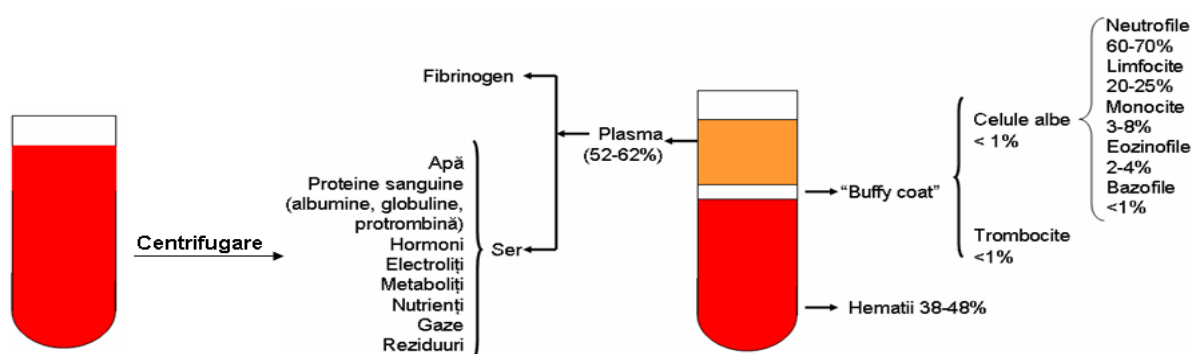


Figura 1.1. Reprezentarea schematică a produselor rezultate la centrifugarea sângelui



Figura 1.2. Centrifugarea sângelui

1. Stratul lichid de culoare gălbuie de la partea superioară este format din **plasmă sau ser**. Diferențele dintre cele două rezidă din modul de procesare a sângelui înainte de a fi supus centrifugării.

Serul se obține atunci când sângele recoltat *fără anticoagulant* este lăsat la coagulat la temperatura camerei timp de 15-30 minute înainte de centrifugare. În cazul sângelui provenit de la pacienți cu tratament de anticoagulare sau probleme de coagulare ale sângelui, coagularea poate dura mai mult. Viteza de coagulare poate fi accelerată prin adăugarea unui agent de coagulare, urmată de inversarea eprubetei pentru omogenizare. Gelul aderent la pereții eprubetei se desprinde cu ajutorul unui bețisor de lemn și eprubeta se centrifughează 10 minute la 3000 rot/min; supernatantul obținut este serul.

Plasma este supernatantul fără elementele figurate obținut în urma centrifugării sângelui *recoltat pe anticoagulant* (citrat de sodiu, heparină, EDTA, oxalat de potasiu); după recoltarea sângelui, eprubeta se inversează de 2-3 ori pentru a se asigura omogenizarea anticoagulantului și se supune centrifugării timp de 15 minute la 3000 rot/min pentru a sedimenta elementele figurate; supernatantul rezultat este plasma; conținutul mai mare în fibrinogen și alți factori de coagulare, precum și de proteine în plasmă comparativ cu serul, fac ca aceasta să aibă o vâscozitate mai ridicată.

Anticoagulantul folosit la obținerea plasmelor poate interfera în analizele de laborator ca urmare a legării unor analiți (eritrocite) și din acest motiv în analizele de laborator se folosește mai frecvent serul sau sângele integral.

Diferențele dintre plasmă, ser și corelația acestora cu sângele integral sunt prezentate în Tabelul 1.1.

Tabelul 1.1. Diferențele dintre plasmă, ser și corelația cu sângele integral

Plasmă	Ser
Este lichidul separat în urma prevenirii coagulării prin adăugarea de anticoagulant	Este lichidul rezultat după coagularea sângelui
Supernatantul separat prin centrifugarea sângelui recoltat cu anticoagulant	Supernatantul separat prin centrifugarea sângelui recoltat fără anticoagulant lăsat să se coaguleze la temperatura camerei
Conținut proteic mai ridicat care îi conferă densitate mai ridicată	Conținut proteic mai scăzut – densitate redusă
Conține factori de coagulare (fibrinogen) Se mai numește sânge fără celule roșii	Nu conține factori de coagulare (fibrinogen) Se mai numește <i>plasmă defibrinată</i> sau <i>plasmă rămasă după defibrinare</i>
Nu necesită deprinderea coagulului de pe pereții eprubetei	Necesită desprinderea coagulului de pe pereții eprubetei
La centrifugare se separă 3 straturi: supernatantul (plasma), stratul intermediar "Buffer coat" (celule albe și trombocite) și stratul inferior (hematii)	La centrifugare se separă 2 straturi: supernatantul (serul) și faza solidă (sânge coagulat – celule sanguine, trombocite în cheag de fibrină)
Obținerea acestuia necesită un interval de timp mai scurt	Obținerea acestuia necesită un interval de timp mai lung
Poate fi păstrată pentru 5 zile la temperaturi de 1 ÷ 6 °C, 1 an la -18°C sau 7 ani la -65°C	Poate fi păstrat pentru o perioadă scurtă de timp (7 zile) prin răcire la -4 ÷ -28°C Pentru păstrarea pe o perioadă îndelungată sunt necesare temperaturi foarte scăzute (-86°C)
Poate coagula	Nu mai poate coagula
Sângele integral	
Plasmă + celule sanguine	
Plasmă + "Buffy coat" + celule roșii	
Plasmă + trombocite + leucocite + celule roșii	
Ser + factori de coagulare + trombocite + leucocite + celule roșii	

Ca avantaje ale utilizării plasmei în analiza medicală se pot menționa (Guder și colab., 2015):

- economia de timp – sângele poate fi centrifugat pentru obținerea plasmei imediat după recoltare, spre deosebire de ser care necesită timp pentru coagulare (30 minute)
- randamentul de obținere mai ridicat – din același volum de sânge, se poate separa cu 15 - 20% mai multă plasmă decât ser
- prevenirea interferențelor induse de coagulare – coagularea post centrifugare poate împiedica absorbția analiților din ser prin ac în etapa de analiză
- prevenirea influențelor induse de coagulare - procesul de coagulare determină modificări ale constituenților din fluidul extracelular dincolo de limita maximă admisă:
 - creșterea concentrației de trombocite în ser față de plasmă (K^+ , PO_4^{3-} , Mg^{2+} , aspartat aminotransferază, lactat dehidrogenaza, serotonină, Zn^{2+})
 - scăderea concentrației constituenților în ser ca rezultat al metabolismului celular și coagulării (glucoză, proteine totale, trombocite)
 - activarea lizei celulare (eritrocite, leucocite) în sangele necoagulat (celule fără hemoglobină, citokine, receptori)
- risc scăzut de hemoliză și trombocitoliză – în sângele persoanelor sănătoase concentrația de hemoglobina liberă este de 10 ori mai redusă în plasma decât în ser; trombocitele rămân intacte *in vitro*;
- unii constituenți trebuie măsurați doar în plasmă pentru a obține rezultate clinice relevante (serotonina, amoniac)

Dezavantajele aduse de utilizarea în analiză a plasmei în loc de ser (Guder și colab., 2015) sunt legate de prezența anticoagulanților care pot interfera cu metodele de analiză a unor analiți:

- contaminarea cu cationi: NH_4^+ , Li^+ , Na^+ , K^+
- distrugerea trombocitelor: deși potasiul din trombocite nu este eliberat în plasmă la centrifugarea sângelui colectat pe heparină, datele științifice arată că trombocitele rămân deseori deasupra stratului celular și chiar deasupra separatorului de plasmă ceea ce poate cauza creșteri ale concentrației de potasiu în cazul în care se folosește partea inferioară a stratului de plasmă (Guder și colab., 1992)
 - interferența în metoda de analiză din cauza complexării metalelor cu EDTA sau citrat (Boink și colab., 1991)
 - interferența fibrinogenului în tehnicile de analiză imunologică; au fost observate scăderi ale concentrațiilor de TSH și T_3 (Narayanan, 1983)
 - inhibarea reacțiilor metabolice/catalitice de către heparină (Jung și colab., 1999)

- modificări în distribuția ionilor între spațiul intracelular și cel extracelular (Cl⁻, NH₄⁺) în cazul utilizării EDTA sau citratului ca anticoagulanți (Guder și colab., 2009)

- alterarea rezultatelor electroforezei de către fibrinogen

Deși serul este folosit în foarte multe determinări, folosirea plasmei este o alternativă mai bună pentru că implică o procesare mai rapidă iar constituenții din aceasta reflectă mai bine situația patologică a pacientului. Conținutul mai mare în fibrinogen și alți factori de coagulare, precum și de proteine comparativ cu serul, fac ca aceasta să aibă o vâscozitate mai ridicată. În schimb, serul are o concentrație mai ridicată în K⁺, peptide care activează coagularea, trombocite (Ladenson și colab., 1974).

2. Stratul intermediar ("Buffy coat") conține celule albe și trombocite. Este albicios, dar poate fi și verzui din cauza mieloperoxidazei produse de către neutrofile. Stratul este folosit în special pentru extracția de ADN datorită concentrației ridicate de celule nucleate.

3. Stratul inferior este format din celule roșii în cazul separării plasmei, sau amestec de celule sanguine în cheag de fibrinogen în cazul separării serului. Culoarea acestuia variază de la roșu închis la roșu deschis, în funcție de conținutul în oxigen al hematiilor din compoziție.

Obținerea plasmei îmbogățite în trombocite

În condiții obișnuite de centrifugare, plasma este săracă în trombocite. Pentru obținerea **plasmei îmbogățite în trombocite** (*factori de creștere bogați în trombocite (GF)*, *fibrină bogată în trombocite (PRF)*, *concentrate plachetare (PC)*), folosită cu rol terapeutic (epicondilită laterală, osteoartrita genunchiului, căderea părului), se pot aplica două metode (Dhurat și Suresh, 2014):

1. Centrifugare dublă implică următoarele etape: (i) recoltarea sângelui pe anticoagulant; (ii) prima centrifugare în urma căreia se separă cele trei straturi (stratul superior care conține plasma săracă în trombocite, stratul intermediar și stratul inferior cu hematii); (iii) transferul stratului superior și a celui intermediar într-un tub de centrifugare gol și sterilizat; (iv) centrifugarea a doua în urma căreia se separă două straturi: supernatantul care conține plasma sărăcită în trombocite și o fază solidă care conține eritrocite și trombocite. Aproximativ 2/3 din volumul de supernatant din partea superioară se îndepărtează, iar faza solidă se omogenizează în volumul rămas.

2. Metoda "Buffy coat" necesită (i) depozitarea sângelui integral timp de 24 de ore la 20°C; (ii) o etapă de centrifugare la viteză ridicată în urma căreia se separă cele trei straturi: stratul superior (plasmă îmbogățită în trombocite), stratul intermediar ("Buffy coat") care conține

trombocite și celule albe; celule roșii) ; (iii) îndepărtarea stratului superior și transferul stratului intermediar într-o eprubetă goală și sterilă; (iv) separarea celulelor albe, prin centrifugare la viteză redusă sau folosirea unui filtru special (Sweeny și Grossman, 2002; Welsh, 2000).

Erori care pot apărea la separarea serului sau plasmei:

- durată mai ridicată de coagulare de 30-45 minute
- hemoliza – ruperea membranei hematiilor care conduce la deversarea conținutului intracelular în ser sau plasmă; acestea vor avea culoare roșie- roz și trebuie excluse de la analiză; pentru prevenirea hemolizei se pot lua următoarele măsuri: (i) acordarea de timp necesar evaporării alcoolului înainte de puncția pentru recoltarea sângelui; (ii) evitarea îndepărtării acului cu tubul de vacuum activ; (iii) evitarea expunerii probei de sânge la temperaturi extreme (prea cald, prea rece); (iv) evitarea agitării prea intense a eprubetei cu proba de sânge – se recomandă inversiunea eprubetei în locul agitării; (v) respectarea parametrilor de centrifugare (viteză, timp, temperatură).

Centrifugarea cu gradient de densitate a probelor de sânge

A. Izolarea celulelor mononucleare

Pentru **izolarea celulelor mononucleare** (monocite, limfocite) din sângele periferic, sângele din cordonul ombilical și măduva osoasă se folosește **centrifugarea cu gradient de densitate**.

Ca medii cu gradient de densitate se pot folosi **Lymphoprep™** (diatrizoat de sodiu și polizaharide) sau **Ficoll-Paque™** (diatrizoat de sodiu și NaCaEDTA). Acestea sunt medii gata preparate, sterile, cu densitate standard (1,077 g/mL). În Figura 1.3 este exemplificat modul de separare a componentelor din sângele integral prin centrifugare cu gradient de densitate folosind mediul **Ficoll-Paque™**. Sângele defibrinat sau recoltat pe anticoagulant se diluează 1:1 cu o soluție salină echilibrată deoarece limfocitele s-ar putea aglomera în sediment. Prin diluție tendința de aglomerare a acestora este mai redusă. Soluția salină conține glucoză, CaCl₂, MgCl₂, KCl, TRIS și NaCl. Sângele diluat se adaugă cu atenție în tubul de centrifugare care conține mediul Ficoll-Paque™, evitând amestecarea celor două straturi. După o centrifugare de 30 – 40 minute la 400 x g rot/min la temperatura camerei se recoltează stratul aflat la interfața dintre mediul Ficoll-Paque™ și plasmă care conține limfocite, monocite și trombocite. Acestea nu sunt suficient de dense pentru a penetra mediul Ficoll-Paque™ și rămânând ca o bandă la interfața dintre mediu și proba de sânge. Procesul se desfășoară la temperatura camerei deoarece la temperaturi mai ridicate (37°C) crește

tendința de aglomerare a limfocitelor, iar la temperaturi mai scăzute (4°C) tendința de aglomerare scade dar timpul de separare crește.

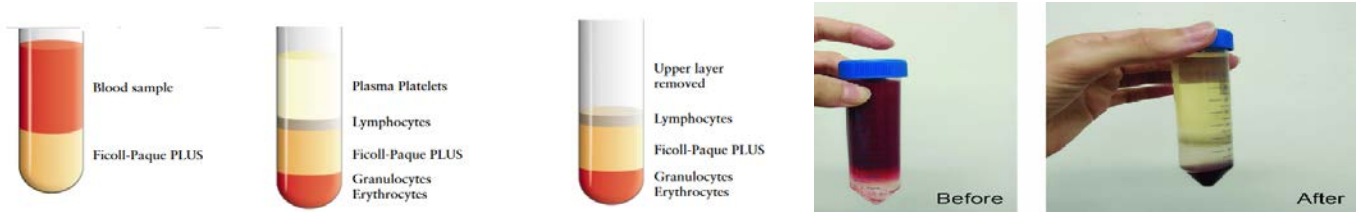


Figura 1.3. Separarea componentelor sângelui integral prin centrifugare cu gradient de densitate folosind mediul Ficol-Paque

Pentru separarea limfocitelor de trombocite, se îndepărtează plasma de la suprafață, stratul intermediar se transferă cu grijă pentru a nu se dispersa într-un tub de centrifugare gol și steril, se adaugă soluție salină și se resuspendă. Se efectuează centrifugarea, se îndepărtează supernatantul, se resuspendă limfocitele într-un volum nou de soluție salină și se efectuează o nouă centrifugare (Prospect Ficol-Paque PLUS). Se observă izolarea a patru fracții: plasmă + trombocite, celule mononucleare (limfocite), mediul Ficol-Paque™ și hematii, leucocite polimorfonucleare și celule moarte.

Mediul Percoll este un mediu gradient cu densitate scăzută folosit pentru separarea celulelor, particulelor subcelulare și a virusurilor mai mari. Vâscozitatea scăzută a mediului permite prepararea celulelor pe gradienti preformați în doar câteva minute folosind forțe centrifuge scăzute (200 - 1000 × g).

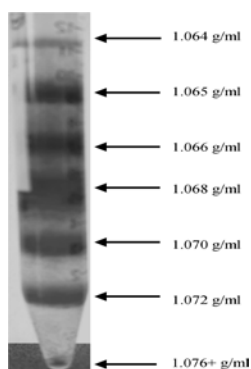


Figura 1.4. Separarea celulelor roșii prin centrifugare cu gradient de densitate folosind mediul Percoll (densitate 1,076 g/mL) (Bizjak și colab. 2017); sunt diferențiate șapte fracțiuni; fracțiunea cea mai ușoară, aflată în partea superioară a mediului este constituită din celule roșii tinere; creșterea densității este asociată cu îmbătrânirea celulelor; fracția cea mai matură este concentrată la baza eprubetei, cu o densitate de minim 1,076 g/mL.

Centrifugarea urinii

Centrifugarea urinii are ca scop separarea sedimentului urinar în scopul examinării microscopice pentru identificarea unor cristale anormale, microorganisme, celule sau cilindrii care ar putea sugera existența unor boli ale tractului renal sau urinar (detalii despre sedimentul urinar pot fi găsite în Capitolul 3).

Din punct de vedere practic, se recoltează 5 mL de probă din urina de dimineață (cea mai concentrată), se introduc în tubul de centrifugare și se realizează centrifugarea (5 minute la o forță de centrifugare relativă de 400 reprezentând 1500 – 2000 rot/min). Se îndepărtează cea mai mare parte a supernatantului cu ajutorul unei pipete sau prin decantare, lasând aproximativ 0,5 mL în care se resuspendă sedimentul depus la baza tubului. O picătură din urina reconstituită se așează pe o lamă, se acoperă cu o lamelă și se observă la microscop. Pentru diferențierea mai precisă a unor componenți urinari anormali de cei normali, urina resuspendată se colorează prin adăugarea unor coloranți specifici (Sudan III, safranină, cristal violet, albastru alcian, pironină B, etc.).

2. ANALIZA SALIVEI

Aspecte generale

Saliva este un lichid incolor, transparent, insipid. Volumul de salivă secretat de glandele salivare pe durata unei zile variază între 600 mL - 1,5 L. În condiții de stimulare, secreția salivară este în jur de 2 - 5 mL/min, iar în condiții de repaus (noaptea) în jur de 0,2 - 0,4 mL/min. pH-ul normal al salivei este în intervalul 6,7 - 7,4, iar densitatea densitatea 1,002 - 1,006 g/cm³.

Din punct de vedere al *tonicității*, saliva este un lichid hipotonic în relația cu plasma.

Punctul crioscopic al salivei variază în intervalul -0,2° și -0,4°C, apropiindu-se de cel al plasmiei (-0,56°) în condițiile secreției maxime.

Din punct de vedere chimic, saliva conține:

- 99.4% apă,
- 0,2% substanțe anorganice (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, Cl⁻, PO₄³⁻, HCO₃⁻, SCN⁻, F⁻)
- 0,4% substanțe organice: proteine și peptide (proteine bogate în prolină, lactoferină, cystatin, staterin, histatine), enzime (amilază, lizozim, lipază, peroxidază), mucine (glicoproteine), micromolecule azotate (uree, creatină, acid uric, uree, etc.), micromolecule neazotate (acid lactic, acid citric), imunoglobuline (IgA, IgG, IGM), molecule lipidice, glucide (glucoză), alți componenți (insulină, albumină, factori de creștere ai pielii).

Componenții existenți în salivă pot fi folosiți ca markeri pentru diagnosticarea unor boli.

Saliva îndeplinește următoarele roluri în organism:

- umectarea alimentelor (mucine, staterine) favorizând formarea bolului alimentar și ușurând deglutiția
- stimulează receptorii de gust de pe limbă ca urmare a solubilizării parțiale a unor componenți din alimente
- inițiază digestia moleculelor complexe (carbohidrați, grăsimi) prin intermediul enzimelor pe care le conține (α -amilază, lipază, mucine)
- prin prezența Ca²⁺, F⁻, PO₄³⁻ previne demineralizarea dinților
- antiviral (cystatine, mucine), antifugal (histatine - ex. Candida) și antibacterial (sIgA peroxidază)
- rol tampon prin conținutul de HCO₃⁻
- protejarea mucoaselor de rănire (mucine, proteine bogate în prolină) sau penetrarea microorganismelor

Analiza fizică a salivei

Volumul și debitul secreției salivare

O secreție salivă bogată (ptialism) se poate asocia cu prezența sarcinii. Ca urmare a schimbărilor hormonale și a grețurilor matinale, gravidele au tendința să secrete mai multă salivă. Ptialismul poate indica de asemenea prezența afecțiunilor hepatice și al ulcerelor bucale.

Debitul secreției salivare se măsoară la 2 ore după ultima masă, în poziție așezată, recoltând saliva care curge de pe buza inferioară pe durata a 15 minute.

Hiposalivația apare atunci când debitul salivar nestimulat scade sub 0,1 mL/min iar cel stimulat sub 0,5 -0,7 mL/min (Ship și colab., 1991; Navazesh și colab., 1992).

Gustul

Gustul amar sau acru al salivei poate fi un indiciu al refluxului gastroesofagian ca urmare a deplasării acidului din stomac spre gât.

Textura

Saliva lipicioasă poate semnala faptul că respirația se face predominant pe gură (apnee) iar aerul inhalat scade umezeala la nivelul cavității orale.

pH-ul și conductivitatea electrică ale salivei

pH-ul salivar este corelat cu cel al sângelui: crește în alcaloze și scade în acidoze.

Principiul metodei

Stabilirea pH-ului se poate face fie cu hârtie de pH fie prin metoda electrochimică. Potențialul redox și conductibilitatea electrică se determină prin măsurători electrochimice.

Aparatură și reactivi

- Probe biologice lichide (urină, salivă, ser, plasmă)
- Hârtie de pH
- pH-metru (WTW inoLab Ph 730)
- Conductometru (EC - $\mu\text{S}/\text{cm}$ - mS/cm WTW inoLab Cond 70)
- Hanna sensor check (H-991003 Potențialul redox EH - mV)
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

A. Determinarea pH-ului cu hârtie indicator

Se inserează hârtia indicator în proba proaspătă de salivă și se așteaptă 2-3 minute până la stabilizarea culorii. Se compară culoarea hârtiei de pH cu scala de culoare.

B. Determinarea electrochimică a pH-ului, a conductivității electrice și potențialului redox ale salivei

Principiul metodei

pH-ul este dat de concentrația ionilor de hidrogen prezenți în soluție. Domeniul 0-7 reprezintă domeniul acid, 7-14 reprezintă domeniul bazic iar pH-ul de 7 corespunde unor soluții neutre. Cu cât pH-ul va fi mai redus cu atât soluția va fi mai acidă, respectiv mai agresivă. pH-ul este definit conform ecuației 2.1 :

$$\text{pH} = -\log [\text{H}_3\text{O}^+] \quad (2.1.)$$

unde $[\text{H}_3\text{O}^+]$ este concentrația molară a ionilor de hidrogen (mol/L).

Conductivitatea electrică este un parametru corelat cu cantitatea substanței anorganice ionizabile din apă. Cu cât soluția conține o cantitate mai ridicată de substanțe anorganice dizolvante, cu atât valoarea conductivității electrice va fi mai mare.

Potențialul redox este un parametru fizico-chimic corelat cu agresivitatea soluțiilor. Cu cât potențialul redox este mai mare cu atât o soluție va fi mai agresivă. Potențialul redox este dat de prezența în soluție a unor ioni în stări de oxidare diferite (de exemplu Fe^{2+} , Fe^{3+}) capabili de a participa în procese redox (Mihaly Cozmuta și Mihaly Cozmuța, 2019).

Modul de lucru

Proba de salivă va fi introdusă într-un pahar Berzelius și se imersează în aceasta electrozii specifici (pH, conductibilitate electrică, potențial). Fiecare electrod va fi curățat cu apă distilată și uscat hârtie de filtru înainte de imersare. Odată stabilizată valoarea indicată de aparat, se va realiza înregistrarea valorii parametrului măsurat. Pentru fiecare probă și pentru fiecare tip de măsurătoare (pH, conductivitate electrică și potențial redox) se vor efectua un număr de minim 3 determinări, prin reluarea procedurii de lucru prezentată anterior (spălarea electrozilor și utilizarea unui nou volum de probă lichidă).

Prelucrarea și interpretarea datelor experimentale

Pentru fiecare parametru determinat (pH, conductibilitate electrică, potențial redox) rezultatul va reprezenta media aritmetică a cel puțin trei determinări, însoțit de valoarea abaterii pătratice standard și de numărul individual al probelor. În cazul unui număr ridicat de determinări pentru același parametru și pe aceeași probă, rezultatul obținut se poate reprezenta sub forma diagramelor de tip box-plot. Anterior calculării mediei aritmetice a valorilor individuale, pot fi utilizate diferite teste statistice de eliminare a datelor necorespunzătoare.

Observații

pH-ul normal al salivei proaspete este în intervalul 6,4 - 7,4. Valori mai scăzute sau mai ridicate apar în stări fiziologice particulare (scăderi după mese și la gravide, noaptea) și patologice (leziuni ale cavității bucale, tulburări sanguine acido-bazice). Pe durata păstrării probelor, pH-ul inițial devine mai bazic datorită pierderii dioxidului de carbon.

Analiza chimică a salivei

Capacitatea tampon a salivei

Principiul metodei

Datorită prezenței atât a compușilor cu caracter acid cât și a celor cu caracter bazic, saliva manifestă caracter tampon, comportându-se ca o bază într-un mediu acid și ca un acid într-un mediu bazic, menținând astfel pH-ul mediului). Capacitatea tampon se definește astfel:

(i) numărul de echivalenți de acid sau bază care modifică cu o unitate pH-ul unui litru de soluție tampon;

(ii) volumul (mL) de acid sau bază de concentrație cunoscută tamponat de un volum specific de soluție tampon.

Determinarea capacității tampon a salivei are la bază măsurarea volumelor de HCl și respectiv NaOH care trebuie adăugate în probe de salivă până la virajul indicatorilor.

Aparatură și reactivi

- Soluție HCl 0,01 N
- Soluție NaOH 0,01 N
- Metilorange (soluție de indicator) 0,1%
- Fenolftaleină (soluție de indicator) 0,1% în alcool
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

6 mL salivă proaspătă se amestecă cu 14 mL apă distilată, și se împarte volumul final în două probe de câte 10 mL. Într-o probă se adaugă 3 picături de indicator metilorange, iar în cealaltă 3 picături de indicator fenolftaleină. Prima probă se titrează cu soluția de HCl N/100, iar cea de-a doua probă cu soluția de NaOH N/100, până la virajul indicatorilor. Se citesc volumele de HCl și NaOH consumate.

Calculul rezultatelor

$$\text{Capacitate bazică/1000 mL salivă} = V_{\text{NaOH}} \cdot F_{\text{NaOH}} \cdot 1000/3 \quad (2.2.)$$

$$\text{Capacitate acidă/1000 mL salivă} = V_{\text{HCl}} \cdot F_{\text{HCl}} \cdot 1000/3 \quad (2.3)$$

unde:

V_{NaOH} , V_{HCl} – volumele de NaOH și HCl folosite, mL

F_{NaOH} , F_{HCl} – factorii soluțiilor de NaOH și HCl, adim.

Activitatea amilazei salivare - Metoda Wohlgemuth

Aspecte generale

Amilaza este o enzimă secretată exocrin, prezentă în serul sanguin sub două forme izoenzimatiche principale: amilaza pancreatică, cu pondere de 40% din amilaza serică totală și amilaza salivară cu pondere de 60% din amilaza serică totală. În cantități mult mai mici, amilaza este prezentă în trompele uterine, sucul duodenal, ficat, intestinul subțire, mușchii scheletici (Laborator Synevo (r), 2010; Fischbach (b), 2009).

Principiul metodei

Metoda are la bază măsurarea eficienței cu care α -amilaza conținută în fluidele biologice atacă legăturile 1-4 din structura amidonului cu formare de dextrine. În prezența iodului, amidonul rămas neatacat se colorează în albastru, intensitatea culorii fiind direct proporțională cu cantitatea de amidon rămasă nedescompusă și invers proporțională cu eficiența enzimei. Colorația roșie care poate să apară se datorește complexilor dextrine-iod care se formează pe parcursul hidrolizei amidonului.

Metoda Wohlgemuth măsoară cantitatea minimă de amilază serică care hidrolizează complet 1 mg amidon în 30 minute la temperatura de 38°C. Metoda nu poate fi aplicată pentru a face diferențierea dintre amilaza pancreatică și cea salivară.

Aparatură și echipamente

- Ser sanguin rezultat din centrifugarea sângelui venos, recoltat pe nemâncate (à jeun) într-un vacutainer fără anticoagulant cu/fără gel separator

- Salivă proaspătă
- Soluție de NaCl 0,9%
- Soluție de amidon 0,1%
- Soluție de KI N/10

Mod de lucru

Se folosesc 8 eprubete în care se adaugă reactivii menționați în Tabelul 2.1. și se observă culoarea formată:

Tabelul 2.1. Determinarea activității amilazei salivare

Reactivi	Numărul eprubetei							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Soluție NaCl, mL	1	1	1	1	1	1	1	1
Salivă, mL	1	1 mL din eprubeta 1	1 mL din eprubeta 2	1 mL din eprubeta 3	1 mL din eprubeta 4	1 mL din eprubeta 5	1 mL din eprubeta 6	1 mL din eprubeta 7 Se aruncă 1 mL din soluția finală
Diluția serului $1/2^n$; n – nr. eprubetei	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64	1/128	1/256
Soluție amidon, mL	2	2	2	2	2	2	2	2
După agitare, eprubetele cu soluții se încălzesc 30 minute pe baie de apă la 38°C, și se răcesc rapid în curent de apă.								
Soluție de iod	1-2 pic.	1-2 pic.	1-2 pic.	1-2 pic.	1-2 pic.	1-2 pic.	1-2 pic.	1-2 pic.
Culoarea formată								

Observații:

Culoare galbenă indică lipsa amidonului

Culoarea albastră indică prezența amidonului nehidrolizat

Culoarea roșie indică prezența dextrinelor – produși de hidroliză intermediară a amidonului

Calculul rezultatelor

Se caută ultima eprubetă în care a avut loc hidroliza amidonului. Activitatea amilazei (UW - unități Wohlgemuth) se calculează înmulțind diluția aferentă eprubetei cu valoarea 2.

Exemplu:

Culoarea albastră se observă în eprubeta cu nr. 5 => amidonul a fost supus hidrolizei până la eprubeta cu numărul 4 a cărei diluție este 1/16 față de saliva inițială.

1/16 mL salivă hidrolizează2 mL sol. amidon 0,1%

1 mL salivă hidrolizeazăx mL sol. amidon 0,1%x mg amidon

$$x = \frac{1 \cdot 2}{\frac{1}{16}} = 32 \text{ UW} \quad (2.4)$$

Pentru a urmări influența temperaturii asupra eficienței amilazei salivare, stativul cu eprubete pregătit conform Tabel 2.1 poate fi introdus la rece (4°C), congelare (-18°C) sau în baie cu apă aflată la fierbere.

Observații:

1. În mod obișnuit, saliva conține de aproximativ 1000 ori mai multă amilază decât serul sanguin, fiind necesară pipetarea cu atenție pentru a evita scurgerea salivei în pipetă.
2. Detergentul poate influența reacția enzimatică, de aceea sprubetele și pipetele trebuie să fie bine spălate cu apă distilată.

Reacții de identificare a componentilor din salivă

Principiul metodei

Identificarea componentilor din salivă are la bază formarea unor compuși de culoare în urma reacției dintre componentii salivei și reactivi analitici specifici.

Aparatură și reactivi

- Salivă
- Soluție CH₃COOH 5%
- Soluție NaOH 5%

- Soluție HCl 5%
- Soluție Na₂CO₃ 20%
- Soluție HNO₃ 5%
- Soluție AgNO₃ 5%
- Soluție HNO₃ concentrat
- Soluție (NH₄)₂MoO₄ 5%
- Soluție BaCl₂ 5%
- Soluția (COO NH₄)₂ 5%
- Soluție FeCl₃ 5%.
- Reactivul biuret se obține prin amestecarea a două soluții:

Soluția A: 4,5 g tartrat de sodiu și potasiu se amestecă cu 40 mL soluție NaOH 0,2 N, 1,5 g CuSO₄·5H₂O dizolvat în 10 mL apă, 0,5 g KI, se omogenizează și se aduce la volum de 100 mL cu NaOH 0,2 N. Soluția se păstrează în sticlă de culoare brună

Soluția B: 5 g KI se dizolvă în 1000 mL soluție NaOH 0,2 N. Soluția se poate conserva timp nelimitat, în sticlă de culoare brună

Soluția de lucru: se dizolvă 1 volum de soluție A cu 4 volume de soluție B. Soluția finală se poate folosi o săptămână, prin păstrare în sticlă brună

- Reactivul Benedict: 173 g citrat de sodiu și 100 g carbonat de sodiu anhidru se dizolvă în 800 mL apă distilată fierbinte și se filtrează. Separat, se dizolvă 17,3 g CuSO₄·5H₂O în 100 mL apă distilată, se amestecă sub agitare cu prima soluție și se aduce la volum de 1000 mL cu apă distilată

- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

A. Identificarea mucinelor (Albu, 2021)

Mucinele au în structură o grupare prostetică din clasa glucidelor care provin de la aminozaharuri. Metoda implică precipitarea mucinei și identificarea părților proteică și glucidică.

a) Precipitarea mucinei: 5 mL de salivă se omogenizează cu 1 mL soluție acid acetic 5%, se filtrează mucina care a precipitat și se identifică

- *Partea proteică se identifică* prin dizolvarea precipitatului în 1 mL soluție NaOH 5% și adăugarea a 1 mL din reactivul biuret. Componenta proteică formează o colorație violet.

- *Pentru identificarea părții glucidice* se folosește restul din precipitat care se fierbe câteva minute într-un volum de 5 mL soluție HCl 5%. După răcire, se alcalinizează cu soluție de Na₂CO₃ 20% și se efectuează reacția Benedict. Din cauza glucidelor reducătoare care prin hidroliza părții glucidice reacția este pozitivă.

B. Identificarea ionilor Cl⁻ (Viman și Mihai, 1994)

Filtratul rezultat de la identificarea mucinei se acidulează cu soluție de HNO₃ 5% și se adaugă soluție de AgNO₃ 5%. Formarea unui precipitat alb (AgCl) dovedește prezența ionilor Cl⁻.

C. Identificarea ionilor PO₄³⁻ (Viman și Mihai, 1994)

Filtratul de la identificarea mucinei se acidulează cu o soluție de HNO₃ conc., se adaugă în picătură o soluție de (NH₄)₂MoO₄ 5% și se încălzește. Apariția unei culori galbene sau a unui precipitat de culoare galbenă indică prezența ionilor de PO₄³⁻.

D. Identificarea ionilor SO₄²⁻ (Viman și Mihai, 1994)

Filtratul de salivă se acidulează cu o soluție de HCl 5% și se adaugă o soluție de BaCl₂ 5%. Prezența ionilor SO₄²⁻ conduce la formarea unui precipitat alb (BaSO₄).

E. Identificarea ionilor Ca²⁺ (Viman și Mihai, 1994)

La filtratul de salivă se adaugă soluție de NH₄(C₂O₄) 5%. Ionii Ca²⁺ formează în urma reacției cu oxalatul de amoniu un precipitat alb (CaC₂O₄).

F. Identificarea ionilor SCN⁻ (Viman și Mihai, 1994)

O porțiune din filtratul de salivă se acidulează cu 1-2 picături soluție de HCl 5% și se adaugă 1-2 picături soluție FeCl₃ 5%. Ionii SCN⁻ formează Fe(SCN)₃, un precipitat roșu. Concentrația SCN⁻ este mai mare la fumători decât la nefumători, ceea ce conduce la o culoare roșie mai intensă.

3. ANALIZA URINII

Tipuri de probe de urină

În funcție de analizele care se vor efectua, se pot recolta următoarele probe de urină (Ridley, 2018):

- **Probă aleatoare** (random) – specimenul de probă cel mai comun supus analizelor datorită ușurinței în colectare; pot conduce uneori la rezultate imprecise, ca urmare a ingestiei de fluide de către pacient care diluează constituenții urinari;

- **Proba de urină primară** (prima urină, jetul mijlociu, urina de 8 ore) – este prima probă de urină a dimineții, cea mai concentrată deoarece rămâne în vezica urinară o perioadă mai îndelungată de timp; se colectează imediat după trezirea pacientului presupunând că pacientul nu a urinat în intervalul culcare-trezire; este specimenul de probă preferat deoarece recoltarea lui reduce gradul de contaminare microbială și bacteriană a urinei; înainte de colectarea lui pacientul își face toaleta locală cu un dezinfectant, eliberează primul jet de urină în toaletă, colectează jetul mijlociu într-un recipient steril și eliberează final în toaletă;

- **Proba de urină secundară** – se referă la colectarea urinei emise pe o perioadă de 24 de ore (ex. toleranța la glucoză); recoltarea începe după ce se elimină prima urină a dimineții;

- **Proba la două ore după masă** – se colectează pentru screening-ul diabetului; se colectează la 2 ore după ingestia de alimente sau băuturi care conțin o cantitate bine definită de glucoză sau carbohidrați;

- **Proba la 24 ore** – se recoltează pentru a monitoriza excreția particulară a unor componente din urină, a căror concentrație poate varia din cauza unor factori (ingestia de lichide, etc.) (creatinină, Na, K, Mg, catecolamine, glucoză, etc.) sau pentru examenul complet de urină; se aruncă prima emisie de urină, iar restul se colectează într-un vas curat împreună cu celelalte emisiuni pe parcursul a 24 de ore;

- **Specimen cateterizat** – se colectează de la pacienții care nu pot urina independent prin intermediul unui cateter;

- **Specimen urinar aspirat suprapubian** – implică extracția urinei direct din vezica urinară a pacientului prin intermediul unei seringi cu ac; se aplică pacienților cu diferite paralizii care nu pot fi cateterizați;

- **Specimen urinar pentru evaluarea prostatei** - se colectează în urma masajului prostatei de la bărbații a căror prostată inflamată reduce debitul urinar;

- **Specimenul urinar pediatric** – se colectează de la copiii foarte mici prin atașarea unei pungi urinare atașată pe piele în zona genitală și menținută până la colectarea unui volum mai ridicat.

Recoltarea și conservarea urinei

Pentru recoltare se folosește un urocultor steril (primit de la laborator sau cumpărat din farmacie). Probele de urină se păstrează la 18-25°C și se analizează în maxim 2 ore de la recoltare. Dacă nu este posibil, proba este stabilă la 4°C maxim 24 ore. Pentru păstrare, se poate congela urina (-20°C) sau se pot adăuga conservanți: toluen (aplicat sub forma unui film subțire pe suprafața urinei), formaldehidă, glutaraldehidă, timol (0,1 g/100 mL urină) sau Cellfix. În momentul în care se dorește analizarea urinei, agenții de conservare se îndepărtează cu ajutorul unei pâlnii de separare. Nu se folosesc conservanți atunci când se urmărește examenul bacteriologic al urinei.

Păstrarea improprie a urinei poate duce la modificări fizice, chimice și microbiologice ale componentelor acesteia, cu efecte negative asupra stabilirii diagnosticului sau tratamentului (Ridley, 2018):

- creșterea densității
- creșterea cantității de sediment urinar prin precipitarea fosfaților amorfi (urina alcalină) sau uraților amorfi (urina acidă)
- creșterea pH-ului care urmare descopunerii ureei la amoniac
- scăderea concentrației de glucoză în urma glicolizei acesteia sau utilizării de către bacterii a glucozei
- scăderea concentrației corpiilor cetonici
- scăderea concentrației de bilirubină în urma expunerii la lumină sau lumină UV
- scăderea concentrației de urobilinogen prin transformarea acestuia în urobilină
- creșterea concentrației de nitriți prin reducerea bacteriană a nitraților
- multiplicarea microbiană care conduce la mărirea turbidității (în special în probele de urină refrigerate)
- dezintegrarea rapidă (minute) a hematiilor și cilindrilor urinari
- modificări de culoare ca urmare a oxidării sau reducerii constituenților urinari.

Analiza urinii

Sumarul de urină include un set de analize fizice, chimice calitative și microscopice care urmăresc punerea în evidență a unor modificări care pot indica stări patologice ale aparatelor urinar, hepatice sau metabolice.

Examenul complet de urină include analiza cantitativă a componentilor din urină.

Valorile obținute în urma examinării urinii se compară cu parametrii specifici urinii normale, variațiile putând fi asociate unor boli (Dronca și colab., 2014).

Tabel 3.1. Compuși din urină

Compusul	Concentrație	
	g/24 ore	mEq/24 ore
NH ₃	0,6 – 0,8	
Na ⁺	0,4	170
K ⁺	-	25 – 100
Ca ²⁺	0,1 – 0,2	5 – 10
Cu ²⁺	< 6*10 ⁻⁵	-
Mg ²⁺	-	1,2 – 2,4
Zn ²⁺	(0,15 – 1,2)*10 ⁻³	-
Cl ⁻	10 – 15	120 – 240
PO ₄ ³⁻	1 – 5 (P ₂ O ₅) sau 0,4 – 2 (P)	-
SO ₄ ²⁻	1,5 – 3,2	-

Tabelul 3.2. Substanțe organice din urină

Substanța	Concentrația/Activitatea
Uree	20 – 35 g/24 ore
Acid uric	0,25 – 0,75/24 ore
Aminoacizi (glicocol)	1 – 2 g/24 ore
Creatină	B < 40 mg/24 ore; F < 80 mg/24 ore
Creatinină	0,8 – 1,8 g/24 ore
Citrat	250 – 700 mg/24 ore
Oxalat	10 – 40 mg/24 ore
17-Cetosteroizi	B 9 – 17 ng/24 ore; F 7 – 12 ng/24 ore
Proteine totale	< 150 mg/24 ore
Amilază	< 490 U/L

Tabel 3.3. Compuși patologici în urină

Substanța	Boli asociate
Proteine	Afecțiuni renale, boli ale căilor urinare, stări febrile
Glucoză	Diabet zaharat
Corpi cetonici	Corpii cetonici sunt produși în urma metabolizării acizilor grași. Prezența lor poate indica diabetul, o dietă săracă în carbohidrați sau diete cetogenice.
Acizi biliari	Icter mecanic și hepatocelular (hepatită)
Pigmenți biliari	Urobilinogenul apare în urină atunci când este redusă

	capacitatea ficatului de a excreta pigmenții biliari. Aceștia conferă urinei culoarea roz pal. Bilirubina este prezentă în urină ca urmare a afecțiunilor hepato-biliare, sau în hemoliză.
“Puroi” (leucocite care au suferit degenerescență granuloasă)	Procese inflamatorii de origine microbiană (ex. cistite)
“Sânge” (hemoglobină/hematii)	Boli ale căilor urinare, boli hemoragice/anemii hemolitice
Nitriți	Simptom al unei infecții bacteriene.

A. SUMARUL DE URINĂ

Analiza fizică a urinei

Volumul urinar depinde de sexul, vârsta și greutatea pacientului. Diureza adulților sănătoși variază între 1000 – 1500 mL/24 ore la femei și 1200 – 1800 mL/24 ore la bărbați. Copiii elimină o cantitate de urină mai mare decât adulții: sugarii, copii mici: 2-3 mL/kg/h; vârstă preșcolară: 1-2 mL/kg/h; vârstă școlară, adolescenți: 0,5-1 mL/kg/h. Volumul urinar este influențat de aportul de lichide, alimentație și factorii de stres.

Volume urinare mari (> 1800 mL, poliurie) sunt caracteristice:

- stări fiziologice normale: emoții, frig, aport ridicat de lichide;
- stări patologice: (i) cauze renale
- afecțiuni ale rinichilor (scleroze renale, glomerulonefrite, etc.); (ii) cauze non-renale (angină pectorală, colici renale, malarie, diabet, etc);

Volume urinare mici (100 mL – 500 mL, oligourie) sunt caracteristice:

- stări fiziologice normale: transpirație abundentă, aport redus de lichide;
- stări patologice: (i) cauze renale (colici renale, scleroze renale); (ii) cauze non-renale (pneumonie, hepatită, diaree, stări febrile)<

Volume urinare foarte mici (50 mL – 100 mL, anurie) sunt determinate doar de cauze patologice: (i) cauze renale (insuficiențe renale); (ii) cauze non-renale (transfuzii de sânge incompatibile, hemoragii masive, traumatisme, etc.).

Densitatea urinei indică eficiența rinichilor în diluarea sau concentrarea urinei față de plasmă și starea de hidratare a pacientului. Densitatea urinei variază invers proporțional cu volumul acesteia. Excepție face urina persoanelor cu diabet zaharat, a căror volum și densitate sunt ridicate din cauza glucozei.

Mod de lucru

Determinarea densității urinii se face cu ajutorul urodensimetrului. Se introduce urina într-un cilindru și se introduce densimetrul. Se citește densitatea pe scala gradată a densimetrului la nivelul urinii.

Semnificația rezultatelor experimentale

- densitate urinară normală: 1,015 - 1,030 g/cm³; urina de dimineață are densitatea mai mare fiind mai concentrată



- densitate urinară > 1,022 (hiperstenurie): nefroze, proteinurie, diabet, insuficiență cardiacă congestivă, toxemie de sarcină, pierderi excesive de apă (transpirații abundente, stări febrile, vărsături, diaree)







- densitate urinară < 1,015 (hipostenurie): diabet insipid, glomerulonefrite, pielonefrite cronice, aport excesiv de apă

- densitate urinară 1,010 – 1,011 (izostenuria): insuficiență renală avansată




- densitate urinară 1,006 – 1,007 (subizostenurie): pielonefrită cronică

Culoarea urinii

Culoare urină		Cauze posibile
Galben-pai		Normală. Culoarea este dată de pigmentii care se găsesc în urină (urocromi, urobilină, porfirină, etc.). Urina nocturnă este mai concentrată și are o culoare mai închisă, iar urina diurnă fiind mai diluată are culoarea mai deschisă.
Maronie		Boală hepatică sau deshidratare severă

Roz-roșiatică-roșie		Hematuris (sânge în urină), pigmenți de proveniență alimentară (sfeclă, afine, rubarbă), prezența urobilinogenului (afectarea ficatului de a excreta pigmenții biliari), medicamente (aspirină, piramidon), porfirinurie, hemoglobinurie
Portocalie-maro		Boală hepatică, afecțiuni ale vezicii urinare, colorant de proveniență alimentară (caroten), administrare de antipiretice
Verde		Pseudomonas, coloranți alimentari, boală genetică rară
Albastră		Absorbția improprie a triptofanului (sindromul scutec-albastru), administrare de albastru de metilen
Violet		Infecții nosocomiale, sindromul pungii violet (punga urinara – pacienți cateterizați uretral – infecții pe tract)
Neagră (melanurie) sau cola		Melanom (porfirie), alkaptonurie (acumulare de acid benzoquinonă acetic-alkapton, intoxicație cu cresol

Transparența urinei

Transparența		Cauze posibile
Transparentă		Normală. Prin păstrarea la rece mai mult timp devine opalescentă și apare un depozit floconos datorită mucusului, leucocitelor și celulelor epiteliale (rezultate din descuamarea căilor urinare). <i>Sedimentul din urinile alcaline</i> este albicios, fiind format din fosfați alcalino-pământoși. <i>Sedimentul din urinile acide</i> este alb-roz, fiind alcătuit din urați.
Turbure		Fosfați (nor roz, alb), bacterii, filamente de mucus, hematii, leucocite, sarcină, pietre la rinichi, secreție vaginală.
Acidulată sau spumoasă		Consum excesiv de proteine, probleme renale.

Mirosul urinei

- normal (slab aromatic datorită acizilor volatili sau substanțe “urinoide”) – specific urinei proaspete
- amoniac (prezența bacteriilor care transformă ureea în amoniac) – boli infecțioase, boli tumorale renale, boli ale căilor excretoare renale
- acetonă, mere sau cloroform (în cetoacidoza - diabet)
- putrid în infecții cu floră anaerobă

Aciditatea titrabilă a urinei

Aciditatea urinei este dată de acizii dizolvați în urină (acid uric, acid citric, fosfați primari, acid hipuric, acid acetic, acid formic, acid oxalic). Aciditatea urinei reprezintă volumul de NaOH 0,1N folosit la neutralizarea 1 L urină sau la urina colectată în 24 ore (medie de 1500 mL).

Aparatură și reactivi

- Soluție NaOH 0,1 N de factor cunoscut
- Soluție de fenolftaleină 1% (în alcool etilic)
- Soluție de HCl 0,1 N
- Instalație de titrare

Mod de lucru

10 mL urină se amestecă cu 2-3 picături de fenolftaleină și se titrează cu NaOH 0,1 N până la culoare roz persistentă cel puțin 30 de secunde.

În cazul în care urina este alcalină (ex. culoare inițială roșie), se determină alcalinitatea urinii prin titrarea acesteia cu HCl 0,1 N în prezență de fenolftaleină.

Calculul rezultatelor

Aciditatea urinii se calculează cu relația:

$$\text{Aciditate urină (mL NaOH 0,1 N / 1 L urină)} = V_1 \cdot 100 \quad (3.1)$$

unde:

V_1 – volumul soluției de NaOH 0,1N folosit la titrare, mL

Alcalinitatea urinii se calculează cu relația:

$$\text{Alcalinitate urină (mL HCl 0,1 N / 1 L)} = V_2 \cdot 100 \quad (3.2)$$

unde:

V_2 – volumul soluției de HCl 0,1 N folosit la titrare, mL

pH-ului urinii (Dronca și colab., 2014)

Determinarea pH-ului urinii are la bază protonarea indicatorilor acido-bazici din structura *indicatorului Guillaumin* de către protonii rezultați din disocierea acizilor urinari.

Aparatură și reactivi

- Indicator Guillaumin: 0,125 g roșu de metil și 0,4 g albastru de bromtimol se amestecă cu 19 mL NaOH 0,05 N și se aduce la 1 L cu apă distilată.

- Scară de pH preparată anterior folosind soluții tampon de pH cunoscut (4,6 – 7) în care se adaugă 10 picături indicator Guillaumin (fiecărei soluții tampon îi va corespunde o anumă culoare în gama roșu-galben-albastru, în funcție de pH-ul acesteia).

Mod de lucru

10 mL de urină se omogenizează cu 10 picături de indicator Guillaumin. Se compară culoarea obținută cu scala de pH.

Observații:

- aciditatea urinii la titrare corespunzătoare urinii normale variază între 200- 450 mL NaOH

0,1N, cu valoare medie de 350 mL NaOH 0,1 N.

- pH-ul urinii normale este cuprins în intervalul 5 – 7
- urinile puternic acide au pH < 5: rinichii îndepărtează excesul de acizi din organism prin febră, urină, diaree abundentă, diabet zaharat, acidoză diabetică sau metabolică, reumatism poliarticular cronic, insuficiență renală decompensată, inaniție, deshidratare
- urinile puternic alcaline au pH > 8: vărsături abundente, aport de lactate și citrice, alcaloză respiratorie și metabolică, infecții ale căilor urinare, dietă vegetariană, afecțiuni tubulare renale, administrare de medicamente alcalinizante (NaHCO₃).
- ritmul circadian afectează aciditatea urinii: dimineața, urina este mai acidă (pH 5,0 – 5,5) și mai puțin acidă sau chiar neutră după aport alimentar din cauza implicării H⁺ în digestia gastrică
- dietele bogate în proteine de natură animală (carne) conduc la urini mai acide deoarece acestea generează prin metabolizare acizi (acid fosforic din fosfolipide, acid sulfuric din aminoacizii cu sulf)
- dietele bogate în vegetale generează urini mai alcaline, deoarece anionii anorganici care se găsesc în vegetale sunt metabolizați până la CO₂ + H₂O și se elimină, iar cationii rămân în urină și îi conferă caracter alcalin.
- nu există întotdeauna o corelație directă între “aciditatea” alimentului consumat și “aciditatea urinii”. Consumul de fructe care conțin cantități mari de acid benzoic (prune, afine) dau o urină acidă deoarece acidul benzoic este metabolizat și eliminat în urină ca acid hipuric care conferă aciditate urinii.

Analiza sedimentului urinar

Sedimentul urinar se analizează microscopic din punctul de vedere a trei componente: celule, cristale și cilindrii (Neuendorf, 2019).

Aparatură și reactivi

- 10 mL urină, din urina proaspătă de dimineață, din jetul mijlociu
- Centrifugă
- Microscop
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru:

10 mL de urină se supune centrifugării 5 minute la 2500 rot/min. Se evită centrifugarea la viteze de rotații mari pentru a evita degradarea unor elemente ale sedimentului urinar. Se aruncă

9,5 mL supernatant, iar sedimentul se resuspendă în supernatantul rămas. Se amplasează o picătură din urină cu sedimentul resuspendat pe o lamă, se acoperă cu o lamelă evitându-se înglobarea bulelor de aer și se examinează la microscop. Se începe examinarea microscopică cu obiectivul mic (x10) pentru orientare (selectarea unor câmpuri microscopice mai bogate în elemente) și se continuă cu obiective mai mari (x20, x40) pentru detalii de structură.


Rezultate experimentale (Tabelul 3.4 – 3.8.):


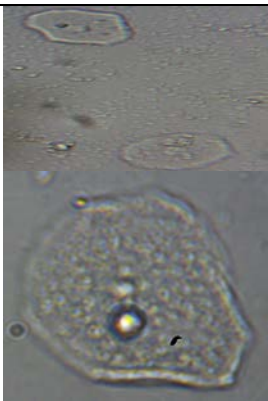
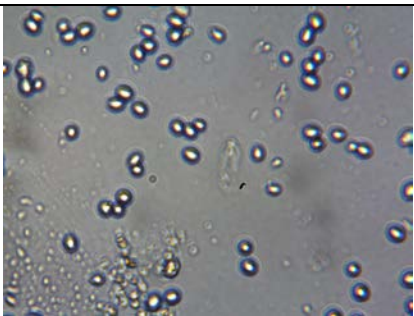
Elementele din sedimentul urinar se împart în două categorii (Dronca și colab., 2014):

- **elemente neorganizate**, care apar în sedimentul urinar și se dizolvă la adăugarea unor acizi, baze sau creșterea temperaturii: organice (acid uric, cistină, tirozină, etc.) și anorganice (oxalați, fosfați, sulfati, etc.)

- **elemente organizate**, care nu se dizolvă la acidifierea, alcalinizarea sau creșterea temperaturii: celule epiteliale, cilindrii, celule, paraziți, spermatozoizi

Tabelul 3.4. Celule din sedimentul urinar

Celule	Descriere
	<p>Celule roșii (eritrocite, hematii) în urină (Hematurie) sunt mici (dimensiune: 6-8 μm), de formă discoidală cu dublu contur (în urinile acide pot deveni crenelate și rotunde în cele alcaline), de culoare galben deschis și fără granulozitate internă (anucleate). Caracteristici (celule roșii mature): - dimensiuni: 8-10 μm, fără nucleu, citoplasma ocupă aproximativ 1/3 din volumul celulei, fără mitocondrii în citoplasmă Se pot diferenția de: - levuri – prin adăugare de acid acetic 5% care lizează hematiile nu și levurile; - cristalele de urat de amoniu (ușor solubile în acid acetic 5%) - picături de grăsime (ușor solubile în eter și cloroform). Prezența lor este asociată unui proces inflamator, a unor traumatisme în urma cateterizării vezicii urinare, calculilor urinari, afectare glomerulară, tumori ale tractului urinar, eforturi fizice intense, medicație (sulfamide). Eritrocitele decolorate (au trecut de filtrul renal) sunt caracteristice bolilor renale, iar eritrocitele care își păstrează culoarea și forma aparțin căilor urinare. În cazul în care prezența hematiilor apare în perioada menstriei, este considerată a fi hematurie falsă.</p>

 <p>Celule albe (https://eclinpath.com/urinalysis/cellular-constituents/wbc-epi/)</p>	<p>Celule albe (leucocite) în urină (Piurie) Caracteristici:</p> <ul style="list-style-type: none"> - sunt mai mari ca hematiile (10-12 μm), formă rotundă/poligonală, incolore, granulozitate internă (granule citoplasmice, nucleu), cu margini neregulate (în urinile acide). - în urinile alcaline sunt atipice (balonizate sau dezintegrate). <p>Leucocitele atipice se diferențiază de:</p> <ul style="list-style-type: none"> - celulele renale – prin colorare cu soluție Lugol, leucocitele devin brune iar cele renale se colorează în galben deschis - fosfați amorfii – prin adăugare de soluție de acid acetic 5% fosfații se solubilizează. <p>Numărul ridicat al celulelor albe (mai mult de 2 pe câmpul microscopic) indică prezența unei infecții ale tractului urinar sau glomerulonefrite.</p> <p>Leucociturii false pot apărea în urma contaminării probei de urină de la meatul uretral sau de la nivel vaginal.</p>
 <p>Celule epiteliale (Obiectiv 40 x 100, colecție personală)</p>	<p>Celule epiteliale pot apărea individuale sau agregate, au structură granulară, forme variabile și dimensiuni mai mari decât eritrocitele și leucocitele, au un nucleu poziționat central. Au origini diferite: uretră, vezica urinară, organe genitale externe (vagin). Cel mai frecvent întâlnite sunt :</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. Celule epiteliale plate sau scoamoase, provin din uretră la bărbați sau vagin la femei. Sunt celule mari, translucide, poligonale sau rotunde, au un nucleu mic poziționat central. În general, sunt fără semnificație patologică. Un număr mare de celule epiteliale asociate cu un număr crescut de celule albe și un nr. redus de eritrocite și celule bacteriene indică un proces inflamator. 2. Celulele tubulare renale au formă cilindrică, vezicale (în rachetă), bazinetale (fuziforme sau ovale), rotundă sau poliedrică și au un nucleu mare amplasat central. În număr mare, sugerează insuficiență renală acută. 3. Celulele epiteliale de tranziție provin din pelvis, uretere, parenchimul renal și sunt foarte asemănătoare cu celulele tubulare. Formează agregate în tumorile renale maligne sau inflamații.
 <p>Drojdii (Obiectiv 40 x 100, colecție personală)</p>	<p>Bacteriile în urină (bacteriuria) provin ca urmare a infecțiilor de la nivelul tractului urinar, sau a contaminării urinei cu flora vaginală și de la nivelul meatului uretral sau depozitării improprii a probelor de urină.</p> <p>Funții provin cel mai frecvent în urma contaminării urinei cu secreția vaginală. Cea mai frecvent întâlnită specie este <i>Candida albicans</i>. Pacienții cu diabet pot prezenta funții ca urmare a conținutului ridicat de glucoză din urină care reprezintă sursă de hrană pentru</p>

personală)	aceștia. Dintre paraziți , <i>Trichomonas</i> apare frecvent în urină în urma contaminării genitale a probelor de urină. Spermatozoizii pot apărea în urină în urma activității sexuale.
------------	--

Cuantificarea celulelor din sedimentul urinar se face în termeni descriptivi pentru fiecare câmp vizual (Tabelul 3.5).

Tabelul 3.5. Cuantificarea celulelor din sedimentul urinar (Ridley, 2018)

Termenul		Descriere
Rare	1+	Prezente, dar nu în fiecare câmp vizual
Câteva	1+	Una sau mai multe prezente în majoritatea câmpurilor vizuale
Moderate	2+	Se observă relativ ușor, dar numărul lor variază în câmpurile vizuale
Multe	3+	Prezente în număr ridicat în fiecare câmp vizual
Aglomerări	4+	Câmpurile vizuale sunt supraaglomerate cu celule asociate



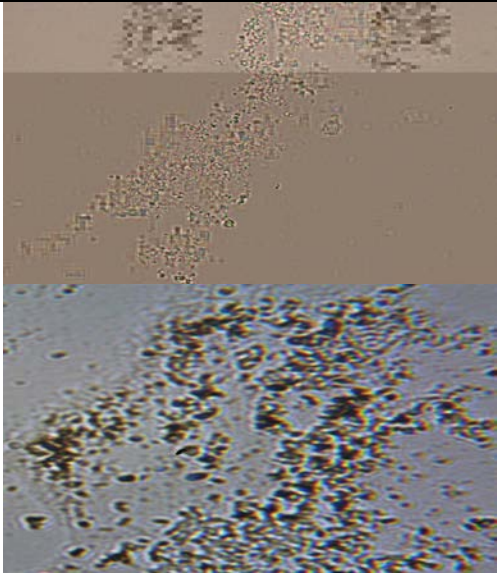
Cristalele din sedimentul urinar apar într-o diversitate mare de forme și culori (Tabelul 3.6).

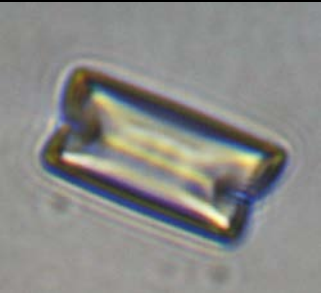
Identificarea cristalelor în urma analizei sedimentului urinar nu implică neapărat aspecte clinice, deoarece acestea tind să se formeze/transforme și după micțiune ca urmare a variației de temperatură (depozitare la temperatura mediului sau refrigerare) sau pH (infecții urinare care degradează ureea) a probelor de urină. Din acest motiv, probele de urină a căror păstrare la temperatura camerei depășește 2 ore nu se pretează la examinarea microscopică.

În funcție de pH-ul urinii, găsim în sedimentul urinar:

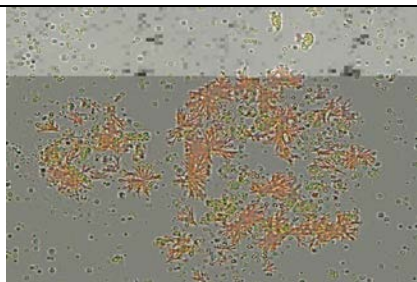
- urina acidă determină precipitarea: acid uric, urați, oxalat de calciu, sulfat de calciu, acid hipuric, urați de Na, K, Mg sau Ca
- urina alcalină determină precipitarea: fosfaț amoniac-magnezian, fosfați de calciu, fosfat bazic de magneziu, carbonat de calciu, urat de amoniu.

Tabelul 3.6. Tipuri de cristale întâlnite în sedimentul urinar (Ridley, 2014; Dronca și colab., 2014)

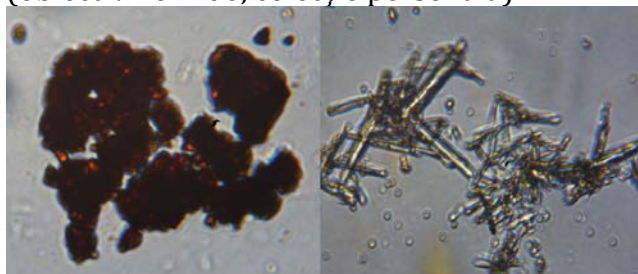
Cristale	Descriere
Cristale găsite în sedimentul urinar specific urinii acide	
 <p data-bbox="113 728 647 801">Cristale de acid uric (obiectiv 40X100, colecție personală)</p>  <p data-bbox="113 1111 647 1189">Cristale de acid uric (obiectiv 40X100, colecție personală)</p>	<p data-bbox="762 331 1441 1189">Cristalele de acid uric sunt de culoare galbenă sau portocaliu-marou, transparente și pot avea forme diferite: în butoi, plate, rombice, aciculare, cubice, lance, stea, halteră, fus. În concentrații mari, pot forma asociații care se pot suprapune pe celelalte componente ale sedimentului urinar. Prezența lor în urină poate fi dată de dieta bogată în proteine (duc la creșterea conținutului de acid uric în urină), litiază renală, gută, chimioterapie, lize tumorale. Apar ca și constituenți normali ai urinii cu pH acid (pH < 5,5). Se dizolvă prin adăugare de NaOH 10%.</p>
 <p data-bbox="113 1760 647 1832">Urați amorfi (obiectiv 40X100, colecție personală)</p>	<p data-bbox="762 1189 1441 1413">Cristalele amorfe apar sub formă granulară sau fină, fără o formă specifică. Pot fi formate din amestecuri de cristale de urați, fosfați, xantină. Având dimensiuni mici, pot fi confundate cu cocii bacterieni de care se diferențiază prin colorare.</p> <p data-bbox="762 1413 1441 1637">Urații (Na, K, Ca, Mg) amorfi se formează în urina acidă, au culoare galbenă sau galbenă-brună, iar în cantitate mare depozitul are culoare roz. Au formă rombică, granulații fine. Se dizolvă în NaOH și reprecipită în prezența de HCl.</p>

	<p>Cristalele de oxalat de calciu sunt incolore, transparente, de forma unor clepsidre sau plicuri. Prezența lor în urină este asociată cu pietrele la rinichi care se formează în urma diete bogate în oxalat (spanac), cu consumul de citrice sau cu ingestia de etilenglicol. Apar în urina acidă.</p> <p>Pot apărea sub formă de cristale de $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sau $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$</p> <p>Cristalele de $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ sunt incolore, sub formă de bipiramide, de dimensiuni diferite.</p> <p>Cristalele de $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ sunt incolore și pot avea forme ovale, biconcave, disc, tije.</p> <p>Cristalele sunt solubile în HCl diluat și insolubile în soluția de acid acetic 10%.</p>
 <p>Cristale de sulfat de calciu (https://cameo.mfa.org/wiki/File:6_Calcium_sulfate_200X.jpg)</p>	<p>Cristale de sulfat de calciu au formă de ac fin, sunt grupate în rozete, sunt incolore și apar la pacienții care au consumat cantități ridicate de ape sulfuroase. Sunt insolubile în soluție de acid acetic 10%.</p>
<p>Acidul hipuric</p>  <p>Cristal de acid hipuric (obiectiv 40X100, colecție personală)</p>	<p>Apare rar în urină, în general în urma consumului de afine, acid salicilic sau acid benzoic. Are formă rombică alungită, este insolubil în soluție de acid acetic 10%</p>
Cristale găsite în sedimentul urinar specific urinii alcaline	
 <p>Cristal de struvit (obiectiv 40X100, colecție personală)</p>	<p>Cristalele de fosfat amoniaco-magnezian (struvit) sunt refringente, incolore, sub forma unor prisme rectangulare ("capac de sicriu") și se pot confunda cu cristalele de oxalat de calciu. Sunt asociate cu infecțiile de tract urinar cauzate de bacterii care degradează urea (<i>Proteus mirabilis</i>), calculi renali (calculi struvit). Apar în urinile alcaline (pH > 7.0).</p>

 <p>Cristale de fosfat tricalcic (obiectiv 40X100, colecție personală)</p>	<p>Cristalele de fosfat de calciu sunt incolore, birefringente, pot avea formă de stea, ace sau plane. Pot apărea singure sau în clustere (plăci granulare sau prisme). Apar frecvent în urina alcalină. În cazuri rare, cristalele de fosfat de calciu sunt asociate cu hipoparatiroidismul.</p>
 <p>Cristale amorfe de fosfat tricalcic (https://www.researchgate.net/figure/Two-calcium-phosphate-crystals-A-amorphous-calcium-phosphate-with-a-large-plate_fig2_363906476)</p>	<p>Fosfații amorfi se formează în urina alcalină, sunt incolori și au formă de prisme rectangulare ("capac de sicriu"). În general, cristalele amorfe nu au asociere clinică.</p>
 <p>Carbonat de calciu (obiectiv 40X100, colecție personală)</p>	<p>Cristalele de carbonat de calciu sunt mari și apar sub formă rotundă cu suprafață netedă. Apar frecvent sub forma unor sfere mari cu striatii radiale, dar și rotunde sau ovoide de dimensiuni mici. În general au culoare galben-marro deschis, iar în concentrație ridicată dau urinei o culoare maronie iar sedimentului un aspect murdar. Sunt asociate frecvent cu pietrele la rinichi.</p>
 <p>Cristale de urat de amoniu (obiectiv 40X100, colecție personală)</p>	<p>Urații de amoniu (biurații) au formă de sfere cu spini țepoși (castane). În unele urini nu au protuberanțe dar au margini netede și seamănă cu cristalele de carbonatul de calciu. Apar des în urina bazică, dar pot fi identificați și în urina normală. Prezența lor în urină este asociată cu urina veche sau contaminată.</p>

Cristale patologice găsite în sedimentul urinar**Cristale de bilirubina**

(obiectiv 40X100, colecție personală)

**Cristale de bilirubina**

(obiectiv 40X100, colecție personală)

Cristalele de bilirubina apar în urină ca rezultat al distrugerii celulelor roșii, care vor traversa ficatul. Apar sub forma unor ace cu structură granulară, mici, de culoare roșie-galbenă. Tind să precipite pe suprafața altor elemente din sedimentul urinar. O concentrație ridicată de bilirubină sau cristale de bilirubină în urină indică boli ale ficatului.

**Cristale de colesterol**



(obiectiv 40X100, colecție personală)

Cristalele de colesterol au forma unor dreptunghiuri lungi, neregulate, transparente, cu o creștătură decupată în colț. Pot apărea după ce proba de urină a fost refrigerată, sau în urinile neutre și acide. Prezența lor indică probleme ale tubului renal (degenerescenta grasă a rinichiului).

**Cristale de cistină**


(https://en.wikipedia.org/wiki/Cystinuria)

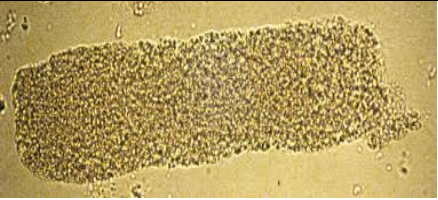
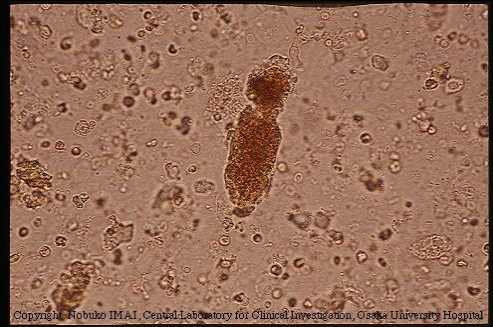
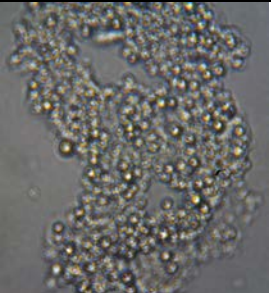
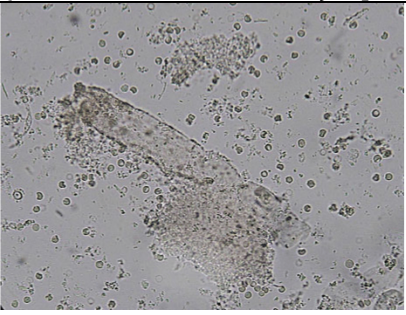
Cristalele de cistină sunt incolore de forma hexagonală (similar inelului benzenic), plate uneori grupate (cisteinurie), incolore. Sunt asociate cu urolitiaza. Apar în urinile acide cu pH < 6.0.


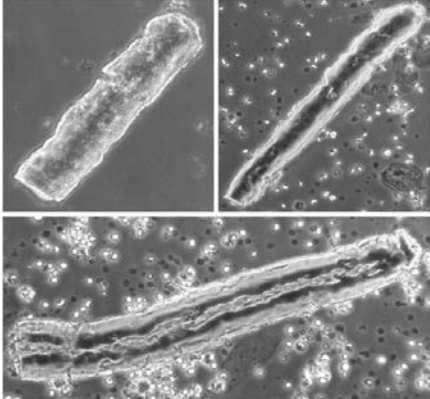


 <p>Cristale de tirozină (https://www.medical-labs.net/tyrosine-crystals-in-urine-362/)</p>	<p>Cristalele de tirozină sunt incolore sau gălbui, au formă de ace, apar doar în urina acidă fie singure, fie grupate sub formă de rozete, mănunchiuri sau stea. Sunt identificate în urina pacienților cu probleme metabolice (insuficiență hepatică) sau tirozinemie.</p>
 <p>Cristale de leucină (https://www.medical-labs.net/leucine-crystals-in-urine-366/)</p>	<p>Cristalele de leucină sunt mici, sferice, strălucitoare, cu dungi radiare și concentrice similar trunchiului de copac, de culoare galben-mar. Apar în urina acidă și sunt asociate cu boli hepatice severe.</p>

Cilindrii din sedimentul urinar sunt agregate de formă relativ cilindrică, produși în rinichi și eliminați în urină. Aceștia se formează în urma precipitarii proteinelor mucoproteine Tamm-Horsfall secretate de către celulele epiteliale ale tubului renal. Având o structură proteică, formarea lor este favorizată de parametrii care determină denaturarea și precipitarea proteinelor: pH acid, concentrația mare de săruri, debit urinar scăzut). Cilindrii pot fi de mai multe tipuri (Tabelul 3.7).

Tabelul 3.7. Tipuri de cilindri urinari (Dronca și colab., 2016)


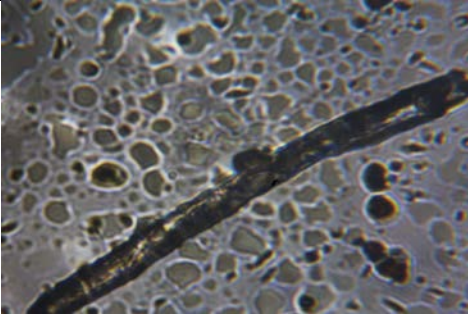
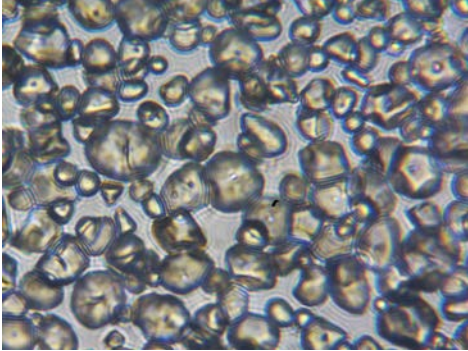
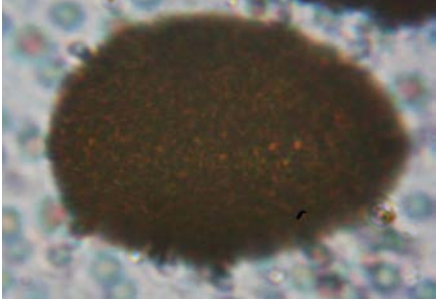
Tip cilindru	Descriere
 <p>Cilindrii hialini (obiectiv 40X100, colecție personală)</p>	<p>Cilindrii hialini provin din tubii urinari (tubii distali și colectori) și sunt frecvent asociați cu deshidratarea, proteinourie, exerciții fizice intense sau ortostatism îndelungat. Sunt dificil de identificat deoarece sunt incolori, omogeni, clari, transparenți, cu contur imprecis, iar indicele lor de refracție este apropiat de cel al urinei. Se pot colora cu albastru de metilen 1%. În număr mare, prezența lor este asociată cu proteinourii din nefropatii sau boli febrile.</p>


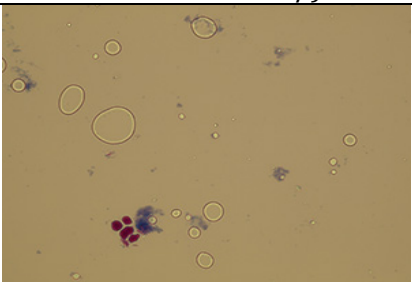

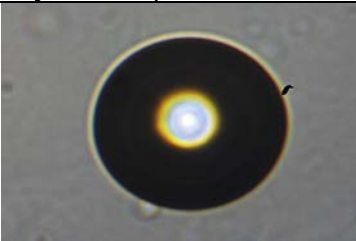
 <p>Cilindrii granulari (http://urine.optmq.connexence.com/Imdoceng/d21d001.html)</p>	<p>Cilindrii granulari sunt bine delimitați, provin din dezintegrarea celulelor epiteliale renale incluse în cilindrii hialini. Apar în procese patologice renale severe (nefropatii acute sau cronice decompensate)</p>
 <p>Cilindrii eritrocitari (hematici) (https://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/hp-lab/www/atlas/ERBCCAST1.html)</p>	<p>Cilindrii eritrocitari (hematici) sunt aglomerări eritrocitare de formă cilindrică și indică că hematuria este de origine renală (ex. glomerulonefrite acute).</p>
 <p>Cilindrii leucocitari (obiectiv 40X100, colecție personală)</p>	<p>Cilindrii leucocitari sunt agregări leucocitare, asociați cu procese inflamatorii ale parenchimului renal (pielonefrite).</p>
 <p>Cilindrii epiteliali (https://ebrary.net/100240/health/epithelial_cell_casts)</p>	<p>Cilindrii epiteliali apar rar, au în structură celule epiteliale descumate.</p>



 <p>Cilindrii grăsoși (https://www.medical-labs.net/fatty-casts-1329/)</p>	<p>Cilindrii grăsoși sunt alcătuiți din aglomerări de picături de grăsime rezultate din degenerescenta celulelor epiteliale. Se colorează în roșu cu colorantul Sudan III. Apar frecvent în intoxicațiile cu fosfor, arsen sau glomerulonefroze.</p>
 <p>Cilindrii ceroși (Spinelli și colab., 2013)</p>	<p>Cilindrii ceroși sunt mați, de culoare gălbuie (similar cerii), bine delimitați, cu creștături marginale, rezistenți la acțiunea acizilor și compoziție incertă. Prezența lor în urină este asociată unor leziuni grave ale parenchimului renal, cu pronostic sever (insuficiență renală cronică).</p>
 <p>Cilindroizii (https://www.renalfellow.org/2023/08/29/cylindroids-in-urine-have-you-ever-seen-it/)</p>	<p>Cilindroizii au în structură mucusul provenit din tubul colector, au formă de panglică cu dungi, cu capetele filate sau despicate și nu semnificație patologică.</p>
 <p>Filamente de mucus (obiectiv 40X100, colecție personală)</p>	<p>Filamentele de mucus apar ca niște benzi translucide, subțiri. Eliminarea în cantitate ridicată este asociată infecțiilor urinare.</p>

Sedimentul urinar mai poate conține și impurități ca urmare a contaminării probelor (Tabelul 3.8.).

Tabelul 3.8. Impurități din sedimentul urinar

Impuritate	Aspect	Sursă
Fibre de vegetale (bumbac, in, câneapă)	 (obiectiv 40X100, colecție personală)	Echipamentul de protecție
Fire de păr	 (obiectiv 40X100, colecție personală)	
Amidon și talc	 Granule de amidon (obiectiv 40X100, colecție personală)	Apar ca urmare a pudrării corpului, utilizării echipamentelor de protecție (mănuși) depozitate în talc sau amidon. Pot fi confundate cu picăturile de colesterol
Granule de polen	 (obiectiv 40X100, colecție personală)	Sunt contaminanți sezonieri. Se pot confunda ușor cu ouăle de paraziți

Grăsimi corporală	 <p>(https://www.renalfellow.org/2020/06/25/urine-sediment-of-the-month-all-about-those-oval-fat-bodies/)</p>	<p>Apare sub forma unor picături ovale – sunt celule care conțin grăsime încorporată în citoplasmă. Pot apărea ca pete închise la culoare (aproape negre).</p>
Picături de ulei	 <p>(https://is.muni.cz/do/med/el/analysis/pages/artefakty_en.html)</p>	<p>Provin prin contaminarea urinei cu creme vaginale sau lubrefianți folosiți la cateterizare. Pot fi confundate cu hematiele</p>
Fibre din scutecele copiilor	 <p>(https://med.libretexts.org/Courses/Oregon_Institute_of_Technology/Urinalysis_Atlas%3A_A_Pictorial_Guide_to_Formed_Elements_in_Urine_%28Doty_and_Taylor%29/5._Artifacts_and_Mucus)</p>	<p>Se desprind din scutece când acestea sunt expuse o perioadă îndelungată contactului cu urina.</p>
Bule de aer	 <p>(obiectiv 40X100, colecție personală)</p>	<p>Apar sub forma unor cercuri cu contur negru în jurul lor. Sunt introduse odată cu pipetarea urinei pe lamă sau prin suprapunerea lamelei.</p>
Fragmente de sticlă sau plastic	<p>-</p>	<p>Apar în urma colectării probelor, pot avea forme și dimensiuni diferite și sunt în generale incolore.</p>

Spermatozoizi	 <p>(obiectiv 40X100, colecție personală)</p>	Contaminare
Fecale	 <p>(obiectiv 40X100, colecție personală)</p>	Igienă necorespunzătoare

B. REACȚII DE IDENTIFICARE A COMPONENTILOR PATOLOGICI DIN URINĂ

Identificarea proteinelor în urină (proteinuria)

Principiul metodelor

Cu excepția unor stări patologice (nefropatii diverse), urina nu conține proteine. Prezența/absența lor în urină poate fi stabilită prin reacții lor de precipitare. Metodele se bazează pe apariția unor precipitate colorate în urma reacțiilor dintre proteinele potențial existente în urină și reactivi specifici (Pintea și colab., 2008; Dronca și colab., 2014).

Aparatură și reactivi

- Urină: urina de dimineață (sau probă de urină spontană), jetul mijlociu după igiena locală; dacă urina este tulbure se centrifughează și se analizează supernatantul;

- Acid acetic glacial
- NaCl 20%
- Acid tricloracetic 10%
- Acid sulfosalicilic 15%
- HNO₃ concentrat
- Reactiv Esbach (acid picric 10 g, acid citric 20 g și 100 mL apă distilată)

- Indicatori de pH
- Tampon acetat 2 N (pH = 4,9)
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

Reacțiile de precipitare se efectuează pe urina acidifiată. Urina neutră (verificată cu indicator de pH) este acidifiată cu picături de acid acetic, se adaugă picături de NaCl 20% și apoi se filtrează.

A. Reacția cu acidul tricloracetic/acid sulfosalicilic: în două eprubete se pun câte 5 mL de urină acidifiată și filtrată. Într-una dintre eprubete se introduc 2-3 mL soluție de acid tricloracetic 10% sau acid sulfosalicilic 15%, se omogenizează și se compară cu eprubeta în care nu s-a adăugat reactiv. Se analizează pe fond negru. Rezultatele posibile:

Grad de turbiditate	Apreciere & notare
Urina rămâne limpede	albumină absentă
Opalescență sau inel alb slab vizibil	urme
Nor distinct, dar fără granule sau flocoane	+
Nor distinct cu granule definite	++
Nor dens cu flocoane marcate	+++
Precipitat dens cu cheag solid	++++

Reacțiile fals pozitive apar în pacienților diabetici tratați cu antidiabetice orale (tolbutamid), sau după administrarea unor antibiotice (familia cefalosporinelor) etc.

B. Reacția (Heller)

În 4 mL urină se introduc la baza eprubetei 2 mL soluție HNO₃ concentrat fără să se amestece. Apariția la limita de separare dintre urină și reactiv a unui inel alb, insolubil la cald indică prezența albuminelor în urină. Dacă în urină sunt pseudoalbumine, inelul apare deasupra limitei de separare a celor două lichide.

Reacțiile fals pozitive rezultă în analiza urinei conservată cu timol, sau cu conținut ridicat de urați și uree. În cazul existenței mucoproteinelor produse de mucoasa căilor urinare apare doar o turbureală, fără a fi sub formă de inel.

C. Reacția Esbach

Peste un volum de 3-4 mL urină se adaugă 1 mL reactiv Esbach. În cazul prezenței proteinelor în urină va apărea un precipitat insolubil la cald.

D. Reacția cu acid acetic

În 10 mL urină filtrată se adaugă câteva cristale de NaCl, se încălzește până la fierbere doar în zona superioară a coloanei de lichid și se acidulează cu picături de soluție de acid acetic. Formarea unui precipitat dovedește prezența albuminei care poate fi cuantificată semicantitativ:

- opalescență și sedimentare la câteva minute cca 10 mg/100 mL
- precipitare și sedimentare imediată cca 50 mg/100 mL
- înălțimea coloanei de precipitat/înălțimea coloanei de urină după 30 de secunde:
 - 1 : 4 cca 250 mg/100 mL
 - 1 : 3 cca 500 mg/100 mL
 - 1 : 2 cca 1000 mg/100 mL

E. Reacția Bence-Jones (proteine termosolubile)

Se folosesc urinile pozitive la reacțiile de precipitare. 4 mL de urină se omogenizează cu 1 mL tampon acetat și încălzește la 56°C pe baie de apă până la formarea unui precipitat. Eprubeta se introduce timp de 3 minute în apă la fierbere, clarificarea turbidității și descreșterea masei de precipitat confirmă la 56°C prezența proteinelor Bence-Jones. Precipitatul inițial reapare prin răcirea eprubetei la 56°C.

Proteinele Bence-Jones sunt imunoglobuline cu lanțuri ușoare, care apar în proporție de 60% din cazurile cu mielom multiplu și uneori în alte boli care afectează măduva osoasă: metastaze osoase, leucemii, unele disproteinemii, osteosarcoame (tumori canceroase ale țesutului osos).

F. Reacția cu tetra-bromfenol (test orientativ): se impregnează o hârtia reactivă cu albastru de tetra-bromfenol (culoarea este galbenă deschis în mediu acid pH ≈ 3). Dacă există proteine urinare, culoarea virează de la galben spre verde, verde-albăstrui, albastru sau violet în funcție de natura proteinei și de concentrația în urină a acesteia. Dozarea se face comparând culoarea obținută cu o scală de etalonare.

Identificarea puroiului în urină (piuria)- Metoda Donné

Principiul lucrării:

Puroiul este un lichid de inflamație constituit din leucocite, celule degenerate și moarte, bacterii. Este prezent în urină ca rezultat al unor procese inflamatorii ale tractului urinar (uretrită, pielonefrită, cistită). Metoda de identificare are la bază lizarea membranei leucocitare sub acțiunea NaOH, eliberarea mucinei care va crește vâscozitatea urinei și împiedică eliminarea rapidă a bulelor de aer (Dronca și colab., 2014).

Reactivi și echipamente:

- Urină: urina de dimineață (sau probă de urină spontană), jetul mijlociu după igiena locală
- Soluție NaOH 20%
- Sticlărie de laborator

Modul de lucru

5 mL de urină se alcalinizează cu o soluție de NaOH 20%. Se omogenizează prin inversie și se observă interiorul soluției:

Rezultate posibile

Observare	Apreciere & notare
Bulele de aer se ridică rapid	negativ
În prezența puroiului apar bule de aer în lichid care stau mult timp în suspensie și se ridică încet spre suprafață. Testele pozitive trebuie neapărat confirmate prin analiza sedimentului urinar.	
Toate bulele de aer se ridică lent spre suprafață	+
Bulele mici rămân pe fundul eprubetei	++
Bulele mari de aer nu se pot ridica din cauza prezenței unei cantități mari de mucină	+++

Interpretare:

Pot apărea probe fals pozitive în cazurile de albuminurie masivă, din cauza prezenței polizaharidelor, a mucinei, etc.

Identificarea glucidelor urinare (glicozuria)**Principiul lucrării**

În condiții normale, urina conține cantități mici de glucide (sarcină, dietă bogată în carbohidrați). Prezența unui conținut ridicat de glucide (glicozurie) este specifică diabetului zaharat. În stări patologice specifice, pe lângă glucoză urina mai poate conține: fructoză, galactoză, lactoză, maltoză și pentoze. Aproximativ 40% din gravidele aflate în a doua parte a sarcinii și lăuzele pot prezenta *lactozurie*. Identificarea glucidelor urinare are la bază proprietățile reducătoare ale acestora față de sărurile unor metale (Cu, Bi). Și alte substanțe reducătoare din urină, pot da rezultate fals pozitive (cantități mari de acid uric, creatinină, acid ascorbic, fenoli, etc.). De asemenea, unele medicamente eliminate prin urină (dextranul, penicilina, streptomicina) pot reduce sărurile metalice. Pornind de la acest aspect, înaintea analizei calitative a diferitelor tipuri de glucide urinare, se înlătură substanțele reducătoare neglucidice din urină (defecare).

Aparatură și reactivi

- Urină deproteinizată
- Reactiv Courtonne: 100 g acetat de plumb se dizolvă în apă distilată, se neutralizează cu acid acetic glacial (control cu hârtie indicator), se filtrează și se aduce la volum de 1 L cu apă distilată
- Reactiv Nylander: 20 g azotat de bismut, 40 g sare Seignette (tartrat dublu de sodiu și potasiu) și 100 g NaOH se dizolvă în apă și se aduce la 1000 mL
- Reactiv Benedict: a) Se solubilizează 173 g citrat de sodiu anhidru și 90 g carbonat de sodiu anhidru în 600 mL apă distilată la cald. Se filtrează și se adaugă apă distilată până la 850 mL. B) Se solubilizează 17,3 g sulfat de cupru ($\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$) în 100 mL apă distilată și se completează la 150 mL. Soluția "a" se toarnă sub agitare în soluția "b"
- Reactiv Barfoed: 13,3 g acetat de cupru se dizolvă în 200 mL apă distilată, se filtrează și se adaugă 1,8 mL acid acetic glacial
- Soluție NH_3 25%
- Soluție KOH 20%
- Reactivul Seliwanoff: 0,15 g rezorcină și 100 mL acid clorhidric concentrat se dizolvă în apă distilată până la 200 mL
- Reactivul Bial: 6 g orcină se dizolvă în 200 mL alcool etilic 96% și se adaugă 40 picături sol. FeCl_3 10%
- HCl concentrat
- Soluție 1% de fructoză, arabinoză, glucoză
- Soluție fenilhidrazină în acid acetic glacial 10%
- Soluție acetat de sodiu 25%
- Acid acetic glacial
- Reactiv Patein: se dizolvă 200 g acetat de mercur în 600 mL apă distilată, se alcalinizează (indicator hârtie de turnesol) cu soluție de hidroxid de sodiu 10%. Se trece într-un balon cotat de 1000 mL și se completează cu apă distilată la semn. Reactivul nu se alterează
- Reactiv Fehling I: 35 g CuSO_4 , 5 mL H_2SO_4 conc./1 L soluție
- Reactiv Fehling II: 300 mL NaOH 30%, 150 g sare Seignette/1L soluție
- Soluție NaOH 10%
- Soluție de iod – iodură de potasiu 0,1 N
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

A. Defecarea (deproteinizarea) urinii

Se amestecă 45 mL urină cu 5 mL reactiv Courtonne, se decantează precipitatul și se filtrează.

B. Reacția Nylander

5 mL urină deproteinizată amestecată cu 1 mL reactiv Nylander se încălzește timp de 4 minute. Dacă proba conține glucoză, rezultă un precipitat brun-negru. Pot exista reacții fals pozitive în cazurile de proteinurie majoră (precipitat brun de sulfură de bismut generat de reacțiile de reducere ale unor grupări funcționale ale radicalilor aminoacizilor).

C. Reacția Benedict (semicantitativă)

La cald, gruparea carbonil din glucidele reducătoare reduce Cu^{2+} din reactivul Benedict la Cu^+ (păstrarea în soluție a Cu^{2+} se face prin complexare cu citrat de sodiu), cu formarea unui precipitat de Cu_2O (roșu-cărămiziu). Toate glucidele reducătoare dar reacție pozitivă. 0,5 mL urină deproteinizată se amestecă cu 5 mL reactiv Benedict, se menține amestecul de 5 minute la fierbere pe baie de apă, se răcește la temperatura mediului și se analizează :

Culoare	Rezultat	Substanțe reducătoare, mg/100 mL urină
Albastru	-	Absente
Albastru-verzui	Urme	Urme
Verde opalescent	+	cca 0,5
Brun-verzui	++	cca 1,0
Galben	+++	cca 1,5
Roșu-cărămiziu	++++	cca 2,0

D. Reacția Barfoed

În mediu slab acid, monozaharidele reduc Cu^{2+} la Cu^+ (Cu_2O). Metoda se folosește la identificarea monozaharidelor în prezența dizaharidelor reducătoare (lactoză, maltoză), pentru care această reacție este negativă. În mediu slab acid viteza de reducere a $\text{Cu}^{2+} \rightarrow \text{Cu}^+$ este mult mai redusă decât în mediu bazic (precipitat roșu-cărămiziu). 2 mL urină se amestecă cu 2 mL reactiv Barfoed, se încălzește amestecul la fierbere timp de 5 minute. Formarea pulberii roșii de Cu_2O indică existența monozaharidelor reducătoare.

E. Reacția Wöhlk (evidențierea Lactozuriei)

Se aplică pentru diferențierea glucozei de lactoză. Urina care conține lactoză amestecată cu NH_3 și KOH și încălzită la 60°C , se colorează în roșu. 5 mL urină se amestecă cu 5 picături soluție KOH și 3 mL soluție NH_3 și se încălzește 30 de minute la 60°C pe baie de apă. În prezența lactozei în

urină apare colorația roșie. Glucoza prezentă în urină în concentrații mari duce la colorație brună, iar galactoza formează culoare galben deschis.

F. Reacția Seliwanoff (identificarea fructozei urinare)

În prezența HCl concentrat și a rezorcinei (sau a altor polifenoli) monozaharidele formează produși de condensare colorați. Dacă în probă există cetoze, reacția decurge mai intens cu obținere de produși roșii, iar în cazul aldozelor se obțin compuși roz. Reacția servește la specierea cetozelor de aldoze. 0,5 mL urină de analizat se amestecă cu 5 mL reactiv Selivanoff. În paralel se execută două probe martor: (i) 0,5 mL urină fără fructoză și (ii) 0,5 mL urină cu conținut de 1% fructoză. Probele se aduc la fierbere. În prezența fructozei apare o colorație roșu intens, care la răcire depune un precipitat solubil în mediu alcoolic.

Fructozuria esențială este o boală ereditară cauzată de blocarea transformării normale în ficat a fructozei în glucoză ca urmare a deficitului fructokinazei. De asemenea, poate apărea o fructozurie alimentară în unele boli hepatice și diabet.

G. Reacția Bial (identificarea pentozelor urinare)

În prezența *orcinei* (metilrezorcina) și a mediului puternic acid, pentozele dau o reacție de culoare. 5 mL reactiv Bial și 0,5 mL urină de analizat se omogenizează. În paralel se efectuează două probe martor: (i) unul cu urină fără conținut de pentoză și (ii) cu urină care conține 1 mL soluție 0,1% de pentoză (arabinoză sau xiloză). Probele se fierb și se lasă la răcit. În cantități reduse, pentozele dau culoare verde, iar în cantități ridicate formează un precipitat verde. Culoarea este solubilă în alcool amilic.

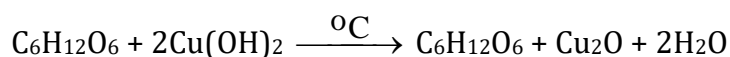
Pentozuria alimentară se produce după un consum bogat în fructe bogate în pentoze.

H. Reacția cu fenilhidrazină

Reacția se folosește în cazul femeilor gravide pentru a diferenția glucoza de lactoză. 10 mL urină defecată (sunt eliminate alte substanțe reducătoare pe care le-ar putea conține urina) se omogenizează cu 1 mL soluție fenilhidrazină, 1 mL acid acetic glacial și 1 mL soluție acetat de sodiu 25%. Se fierbe pe baia de apă timp de 1 h, se filtrează la cald și se răcește. Glucoza în concentrație > 4 g/1000 mL formează *glucosazonă* insolubilă la cald, apare microscopic sub formă de ace galbene aurii dispuse în snopi. Un aspect asemănător are și *fructosazonă*. În cazul prezenței în urină a maltozei sau lactozei, osazonele acestora vor cristaliza la rece în ultima eprubetă. Microscopic, *cristalele de lactosazonă* se văd forma unor de rozete, iar cele de *maltosazonă* sub formă lamelară cu lamele unite prin una din extremități.

I. Reacția cu reactiv Fehling

Metoda are la bază oxidarea la cald a glucozei cu reactiv Fehling la acid gluconic și oxid cupros (pp. de culoare roșie).



Mod de lucru

1 mL soluție Fehling I se amestecă cu 1 mL soluție Fehling II și se încălzește la fierbere. Se adaugă 2 mL urină și se continuă fierberea. Apariția precipitatului roșu de Cu_2O demonstrează prezența glucozei în urină. Cantitatea de precipitat este direct proporțională cu concentrația glucozei în urină.

Trebuie de menționat că testul nu este specific glucozei, acesta pune în evidență toate glucidele cu caracter reducător (lactoza din urina femeilor gravide, pentoza - pentozurie) sau alți compuși cu caracter reducător (acidul ascorbic, medicamente).

Identificarea corpiilor cetonici în urină (cetonurie)

Pricipiul metodelor

Corpii cetonici (acidul β -hidroxibutiric, acidul acetoacetic, acetona) sunt produși ai metabolismului lipidic, iar când este afectat catabolismul acizilor grași se elimină prin urină, în special acidul β -hidroxibutiric și acidul acetoacetic (ultimul se decarboxilează în urina păstrată la temperatura camerei și se transformă în acetonă). Aceștia ajung în urină doar când concentrația lor plasmatică crește peste valoarea pragului renal.

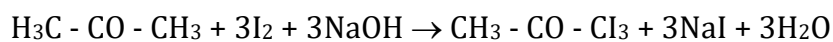
Metodele de identificare se bazează pe reacția dintre corpii cetonici sau compușii specifici rezultați din degradarea acestora (cetone) și reactivi de culoare cu formare de precipitate colorate.

A. Reacția Legal (identificarea acetonei)

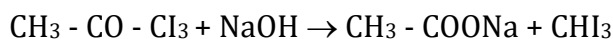
3 mL urină se amestecă cu 5 picături de soluție de nitroprusiat de Na 10% și 2-3 picături de NaOH 10% până la pH bazic. Formarea culorii roșii/portocalii se datorează fie prezenței acetonei fie a creatininei urinare. Dacă după adăugarea a 1-2 mL acid acetic glacial culoarea dispare, înseamnă că nu există acetonă, în timp ce intensificarea culorii cu virajul acesteia spre roșu-violet sugerează existența acetonei. Intensitatea culorii este direct proporțională cu concentrația corpiilor cetonici din urină. Reacția poate apărea și în prezența unor medicamente (salicilați - Aspirina). Pentru diferențiere între acetonă și creatinină, se fierbe urina câteva minute pentru îndepărtarea acetonei. Reacția pozitivă inițială, care nu mai apare după fierberea unei probe duplicat din urina analizată, indică prezența creatininei.

B. Reacția Lieben (identificare acetonă)

Acetona din urină reacționează cu iod în mediu alcalin și formează iodoformul, recognoscibil prin miros.



tri-iod-acetona



iodoform

Aparatură și reactivi

- Urină recoltată după proceduri standard
- Soluție de I₂ 0,1N
- Soluție de NaOH 10%

Mod de lucru

5 mL urină se amestecă cu 1,5 mL NaOH 10% și 1,5 mL iod 0,1 N. Dacă în probă există acetonă, se formează un precipitat galben și apare mirosul specific de iodoform.

Interpretare:

Corpuri cetonică se formează în urina persoanelor cu diabet zaharat netratat. Principala sursă de energie a acestora vor fi acizii grași, ceea ce va intensifica cetogeneza hepatică. Acetonuria apare în diete alimentare bogate în lipide și proteine, sărace în glucide, malabsorbție intestinală, înfometare, diaree, vărsături, boli metabolice.

Identificare pigmentilor biliari în urină

Pigmenții biliari (biliverdina, bilirubina, urobilinogenul, urobilina, stercobilinogenul, stercobilina) sunt derivați pirolici proveniți din catabolismul hemului. Urobilinogenul apare în urină atunci când este alterată capacitatea ficatului de a excreta pigmentii biliari. Bilirubina apare în cantități nedecelabile în urina persoanelor sănătoase și în cantități ridicate în urina persoanelor cu afecțiuni hepato-biliare, icter obstructiv, hepatită și hemoliză. Urobilinogenul și stercobilinogenul (rezultă în urma reducerii bilirubinei), sunt substanțe incolor, care în prezența aerului se oxidează parțial formând urobilină, respectiv stercobilină (substanțe colorate) (Dronca și colab., 2014).

Culoarea urinei variază între galben și brun-închis, cu nuanță verzuie, în funcție de

cantitatea de bilirubină eliminată. Bilirubina eliminată în urină este instabilă și din acest motiv reacțiile de identificare trebuie efectuate imediat de la emisie. Bilirubina este fotosensibilă și urina trebuie păstrată la întuneric. În urina normală pot exista doar urme de bilirubină, care nu dă reacții pozitive la identificare. Concentrații ridicate de bilirubinei în urină apar în icterele prin hepatită și obstrucția căilor biliare.

Dozarea bilirubinei se poate face fie prin oxidarea acesteia la biliverdină fie prin transformarea acesteia într-un colorant azoic (Pintea și colab., 2008; Laborator Synevo (I), 2010).

Aparatură și reactivi

- Urină: prima urina de dimineața (sau o probă de urină spontană), jetul mijlociu, după o prealabilă toaletă locală
- Reactiv Fouché: 20 mL soluție acid tricloracetic 20% + 2 mL soluție de clorură ferică 5%
- Reactiv Popper: 525 mL apă distilată se amestecă cu 125 mL alcool 95°, 3,5 mL tinctură de iod 10% și apoi se adaugă 12 g KI și 27 g NaCl
- Reactiv Ehrlich: 2 g p-dimetilaminobenzaldehidă se dizolvă în 100 mL HCl 20%
- Cloroform
- Soluție de BaCl₂ 10%
- Soluție de K₂Cr₂O₇ 4%
- Soluție de H₂SO₄ 20%
- Soluție de albastru de metilen
- Soluție Lugol
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

A. Metoda Fouché

2,5 mL soluție 10% BaCl₂ se amestecă cu 5 mL urină proaspătă. Precipitatul care apare conține complexul sulfat-bilirubină. Se filtrează soluția iar pe depozitul gălbui rămas pe hârtia de filtru se adaugă câteva picături de reactiv Fouché. În prezența pigmentilor biliari apare o colorație verzuie.

B. Metoda Ionescu-Martin

5-6 mL urină se amestecă cu 10 mL soluție BaCl₂ și se agită. Precipitatul de bilirubinat de calciu se filtrează și pe hârtia de filtru se spală cu un amestec de K₂Cr₂O₇ și H₂SO₄ (4:1 v:v). Formarea unor zone concentrice colorate în verde-albăstrui în punctele de reacție indică prezența bilirubinei.

C. Metoda Kalk și Wildhirt

2-3 mL urină proaspătă se amestecă cu 1 picătură soluție albastru de metilen. Colorația verde (biliverdină) indică prezența bilirubinei.

D. Proba Popper

Metoda are la bază oxidarea bilirubinei (roșie) la biliverdină (de culoare verde) cu ajutorul iodului. 5 mL urină se pun în contact cu 2 mL reactiv, evitând amestecarea celor două lichide. Reactivul a cărui densitate este mai mare se introduce primul în eprubetă. În cazul prezenței bilirubinei, la suprafața de contact dintre cele două lichide apare un inel verde.

După consum de antipirină (analgetic) sau piramidon pot apărea reacții fals pozitive.

Identificarea urobilinogenului și stercobilinogenului – reacția Ehrlich

Urobilinoizii (urobilinogenul, stercobilinogenul, urobilina și stercobilina) sunt derivații hidrogenați ai bilirubinei. Sub influența bacteriilor, în intestin are loc reducerea bilirubinei cu formare de urobilinoizi. Parțial, aceștia sunt reabsorbiți și ajung din nou la ficat prin vena portă (circuitul hepatoenterohepatic al pigmentilor biliari), iar cea mai mare parte este metabolizată.

Metoda are la bază formarea unei colorații roșii intense ca urmare a formării unui compus chinoid în urma reacției în mediu puternic acid dintre urobilinogen/sterobilinogen și p-dimetilaminobenzaldehidă.

Mod de lucru

3 mL de urină se amestecă cu 2-3 picături reactiv Ehrlich, se lasă în repaos un minut. Apariția unei culori roșii intense la temperatura ambiantă, extractibilă în cloroform, indică o concentrație ridicată de urobilinogen. Porfobilinogenul, un intermediar al sintezei hemului- generat în *porfirie intermitentă acută*) formează o colorație similară, dar nu este extractibil în cloroform. Absența colorării cloroformului după ce acesta se amestecă cu compusul colorat în roșu nu se colorează, dovedește prezența porfobilinogenului.

Timp de apariție a culorii	Rezultate
Imediat	Reacție intens pozitivă
După 10 minute	Reacție pozitivă
Nu apare culoare	Reacție negativă

Observație:

Urina supusă analizei trebuie să fie rece. În cazul urinei calde se eliberează indolul care reacționează și el cu reactivul Ehrlich cu formarea unui compus roșu. Reacția bilinogenilor poate fi mascată în cazul prezenței sulfamidele care dau o colorație galbenă.

Identificarea urobilinogenului și stercobilinogenului – reacția cu reactiv Lugol

Sub acțiunea unui oxidant (soluție Lugol) urobilinogenul se transformă în urobilină. În mediu alcoolic și în prezența sărurilor de zinc, urobilina dă o fluorescență verde.

Interpretare:

Următoarele patologii sunt caracterizate de concentrații crescute a urobilinoizilor:

1. Hemoliză masivă: posibilitatea de glucuronoconjugare a ficatului este depășit (funcția hepatică nu este afectată)
2. Afectarea funcției hepatice: ciroză sau intoxicații chimice cu CHCl_3 și CCl_4 , hepatite, ciroză, ictere hepatocelulare
3. Icter prin obstrucție : stadii precoce, obstrucție incompletă

Testul de spumare

5 mL de urină se introduc într-o eprubetă și se agită. Apariția unei spume de culoare galbenă indică prezența bilirubinei.

Identificarea acizilor biliari din urină (colalurie)

Principiul metodelor

Colaluria este specifică icterului mecanic, obstrucția tubului coledoc nepermițând excreția sărurilor acizilor biliari în bilă. Acestea pătrund în fluxul sanguin și sunt eliminate în urină. Colaluria este întâlnită și în icterele date de hepatită, deoarece celula hepatică bolnavă nu mai are capacitatea de excreție a acizilor biliari (Laborator Synevo (I), 2010; Dronca și colab., 2014).

Acizii biliari primari (colic și dezoxicolic) sunt produși ai catabolismului colesterolului la nivel hepatic. Conjuțați cu glicocol sau taurină sau sub formă de săruri (glicocolat, taurocolat, etc.) sunt excrețați în bilă și apoi în intestin unde participă la digestia și absorbția lipidelor. Sub acțiunea bacteriilor din intestin sunt parțial dehidroxilați (în poziția 7) și transformați în acizi biliari secundari (deoxicolic, litocolic). Aceștia sunt absorbiți majoritar în circulația portă și ajung în ficat. Creșterea concentrației lor la nivel plasmatic conduce la eliminarea în urină (Dronca și colab., 2014).

Aparatură și reactivi

- Urină
- Pulbere de sulf (floare de sulf)
- H₂SO₄ concentrat
- Zaharoză 10%
- Sticlărie de laborator

A. Proba Hay

Sărurile acizilor biliari scad tensiunea superficială a urinei și favorizează sedimentarea pulberii de sulf. Se presară pulbere de sulf pe suprafața urinei, iar dacă aceasta conține acizi biliari pulberea de sulf sedimentează în 5 minute. În absența acizilor biliari, pulberea de sulf plutește câteva ore pe suprafața urinei.

B. Reacția Pettenkoffer

Glucidele sunt transformate de către acidul sulfuric în derivații furfurolici, iar aceștia condensează cu acizii biliari formând produși colorați.

Mod de lucru

1 mL apă distilată se omogenizează cu 1 mL urină și 5 picături zaharoză 10%. Pe peretele eprubetei ținută înclinată se prelinge un volum de 2 mL H₂SO₄. Inel roșu-violet format la limita de separare a probei cu reactivul este specific prezenței acizilor biliari. Se efectuează și o probă martor înlocuind urina cu apă. În absența glucidelor, inelul format este brun- cărămiziu.

Identificarea sângelui în urină (hematuria și hemoglobinuria)**Principiul metodelor**

În urină pot apărea hemoglobina liberă (hemoglobinurie) sau hematii (hematurie). Pentru diferențiere se examinează microscopic sedimentul urinar, în primul caz în sediment neobservându-se hematii (Pintea și colab., 2008). Majoritatea testelor de identificare exploatează acțiunea pseudoperoxidazică a hemoglobinei: apa oxigenată oxidează leucoderivatul unui colorant (benzidina, fenolftaleină redusă în mediu alcalin, etc.) în prezența hemoglobinei cu formarea colorantului respectiv (Pintea și colab., 2008 ; Dronca și colab., 2014).

Aparatură și reactivi

- Urină proaspătă: deoarece leucocitele dau reacție peroxidazică (enzimatică), se fierbe urina câteva minute (acidulată în prealabil cu acid acetic)

- Benzidină pură

- Acid acetic glacial

- H₂O₂ 3%

- Reactiv Kastle-Mayer (soluție alcalină de fenolftaleină): se fierb până la completa decolorare 2 g fenolftaleină, 20 g KOH solid, 100 mL apă distilată și 10 g pulbere de Zn. Fenolftaleina este roșie în mediu bazic iar sub acțiunea reductoare a Zn se transformă în leucoderivatul incolor

- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

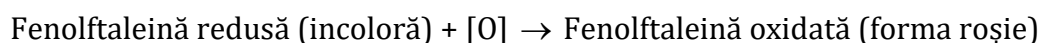
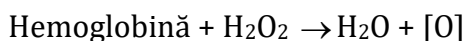
A. Reactia Alder

Sub acțiunea apei oxigenate se eliberează oxigenul din sângele prezent în urină care oxidează benzidina la un compus chinoidiminic care se condensează cu o altă moleculă de benzidină și formează un compus de culoare albastră denumit albastru de benzidină.

Se amestecă 1 vârf de spatulă de benzidină și 10 picături de acid cetic, se omogenizează cu 2 mL urină și câteva picături de apă oxigenată. Dacă urina conține sânge va apare o colorație albastră sau verde în funcție de cantitatea de sânge conținută.

B. Reactia Kastle-Mayer

Oxigenul eliberat din sângele eventual prezent în urină recolorează sub acțiunea apei oxigenate leucoderivatul fenolftaleinei.



Mod de lucru

2-3 mL urină se omogenizează cu 1 mL reactiv Kastle-Mayer și se scurg câteva picături de apă oxigenată pe pereții eprubetei. În prezența urinei în sânge, la limita de separare apare un inel roșu.

Interpretare:

Hematuria macroscopică (vizibilă cu ochiul liber) apare în: chisturi renale, tumori renale, tumori ale căilor urinare (deseori, cancerul renal are hematuria ca primă manifestare), calculi renali, tuberculoză urogenitală, traumatisme, diateză hemoragică, cistită hemoragică.

Hematuria microscopică apare în: colagenoze (boli autoimune cu frecventă afectare renală), calculi ureterali care produc leziuni ale mucoasei, pielonefrită, nefrită interstițială, de însoțire în boli infecțioase, efort fizic, glomerulonefrită (lezarea gravă a filtrului glomerular face posibilă traversarea lui de către hematii).

C. ANALIZA CANTITATIVĂ A COMPONENTILOR URINARI (BIOCHIMIE)

Determinarea spectrofotometrică a nitriților din urină

Principiul metodei

Oxizii de azot joacă un rol important în organismul uman contribuind la menținerea homeostaziei. Timpul lor de viață este scăzut fiind metabolizați în nitrați/nitriți în prezența oxigenului (în vivo de către hemoglobină) sau a bacteriilor.

Bacteriile prezente în urină determină conversia nitriților la nitrați. Din acest motiv, rezultatele dozării nitriților în urină sunt precise doar dacă se evită multiplicarea bacteriilor (păstrarea la rece a probelor de urină). Pe de altă parte, concentrația mare de nitriți în probele de urină proaspăt recoltate indică o infecție urinară bacteriană (*Escherichia coli*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Citrobacter* etc.).

Lucrarea are ca scop stabilirea influenței timpilor și temperaturilor de stocare asupra concentrației nitriților în urină folosind reactivul Griess ca agent indicator și fotocolorimetrarea soluției colorate la 540 nm (Sun și colab., 2003).

Aparatură și reactivi

- Probe de urină: prima urină de dimineață (sau probă spontană de urină), jetul mijlociu, după igiena locală; avantajele primei urini constau în concentrația mai ridicată în metaboliți și absența influenței dietei și activității fizice.

- Reactiv Griess: 1,5 g acid sulfanilic se dizolvă în 450 mL CH₃COOH 10%. Soluția se adaugă peste o soluție de alfa-naftilamină (0,6 g alfa-naftilamină în 60 mL apă fierbinte) și se filtrează. Soluția rezultată se stochează la întuneric pentru a preveni oxidarea, aceasta fiind stabilă 2-4 săptămâni (decompunerea este detectată prin apariția unei tente roz). Activitatea reactivului se testează prin adăugarea catorva picături într-o soluție 10% NaNO₂ și apariția culorii roșii

- Soluție Carez II: soluție 30% ZnSO₄·7H₂O

- Soluție Carez I: soluție 15% $K_4[Fe(CN)_6] \cdot 3H_2O$
- Soluție $NaNO_2$ 0,1 M
- Spectrofotometru UV-VIS
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

A. Construirea dreptei de etalonare: se pregătesc soluțiile menționate în Tabelul 3.9:

Tabelul 3.9. Construirea dreptei de etalonare pentru dozarea nitriților în urină

Reactiv	Număr eprubetă							
	Blank	1	2	3	4	5	6	7
Volum soluție de bază, mL	0	0,2	0,4	0,6	0,8	1	1,2	1,4
Volum apă distilată, mL	5	4,8	4,6	4,4	4,2	4	3,8	3,6
Volum reactiv Griess, mL	1	1	1	1	1	1	1	1
Repaos 10 minute								
Absorbanța la 540 nm în raport cu blank-ul								

Se reprezintă grafic Absorbanța probei = $f(\text{concentrația nitritului în soluție})$ și se extrage ecuația de variație.

B. Prepararea probelor de urină

Lichidele biologice (plasma, urină) au o concentrație ridicată de proteine și o turbiditate ridicată. Din acest motiv, aplicarea tehnicii Griess în cazul probelor biologice foarte încărcate necesită o deproteinizare și limpezire prealabilă prin adăugarea a câte 2 mL din soluțiile Carez I și Carez II /20 mL probă și centrifugare. Supernatantul se folosește la determinarea nitriților.

C. Studiul influenței condițiilor de stocare a urinei asupra conținutului de nitriți

Probe de câte 8 mL supernatant/urină, introduse în eprubete și astupate, se păstrează la temperatura camerei, în etuvă (la 20°C și la 37°C) și în frigider (-4°C). Periodic (1h, 2 h, 3h) se iau volume de 2 mL probă, se amestecă cu 2 mL reactiv Griess și se citește absorbanța la 540 nm. Determinarea concentrației nitriților în probele de urină se face folosind ecuația de variație extrasă din dreapta de calibrare.

Observație:

Se va lucra în paralel și cu probe de urină nesupusă deproteinizării (dar centrifugată pentru îndepărtarea materiilor în suspensie) pentru a compara rezultatele.

Rezultatele experimentale

Rezultatele experimentale se trec în Tabelul 3.10.

Tabelul 3.10. Rezultate experimentale

t = -4°C

Proba	Timpul de păstrare, minute	[NO ₂ ⁻], mg/mL

t = 20°C

Proba	Timpul de păstrare, minute	[NO ₂ ⁻], mg/mL

t = 37°C

Proba	Timpul de păstrare, minute	[NO ₂ ⁻], mg/mL

Se reprezintă grafic Concentrația [NO₂⁻] în funcție de timpul și temperatura de păstrare și se interpretează rezultatele obținute.

Dozarea acidului uric urinar

Aspecte generale

Acidul uric este produsul final rezultat din metabolismul bazelor purinice, acizilor nucleici și nucleoproteinelor. Principalele surse de producere a acidului uric sunt ficatul și mucoasa intestinală. Plasma transportă acidul uric la rinichi, unde acesta este filtrat prin glomerul și eliminat prin urină în proporție de 60% - 70%, iar restul este degradat în tractul gastrointestinal. Atunci când este prezent în sânge în concentrații ridicate, acidul uric tinde să precipite sub forma de cristale care pot declanșa crize de gută (depozitarea cristalelor de acid uric în articulații) sau tulburări (diabet, formarea pietrelor la rinichi).

Dozarea iodometrică a acidului uric urinar

Principiul metodei

Metoda are la bază precipitarea acidului uric sub formă de urat de amoniu și titrarea iodometrică a uratului format (Pintea și colab., 2008; Laborator Synevo (m), 2010).

Aparatură și reactivi

- Urină:

a) urina de 24 ore: la ora 7 dimineața pacientul urinează și nu reține această urină; se colectează toată urina emisă timp de 24 de ore (ora 7 în dimineața următoare) într-un vas curat; după omogenizarea urinei recoltate se măsoară volumul acesteia și din acesta se rețin aproximativ 100 mL; proba se ține la 2- 8°C în timpul colectării și ulterior, până se lucrează efectiv

b) o probă de urină spontană (preferabil prima urină de dimineață)

- Soluție de NH₄OH concentrată

- NH₄Cl

- Soluție de I₂ în KI 0,1 N

- Soluție de amidon 1% proaspăt preparată

- Soluție saturată de borax

- Soluție saturată de NaHCO₃

- Acid acetic

- Instalație de titrare

- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

10 mL urină nefiltrată se omogenizează cu 1,5 mL NH₄OH pentru dizolvarea compușilor urici și 1,5 g NH₄Cl, și după 30 de minute se filtează. Precipitatul se amestecă cu 100 mL apă distilată și acid acetic până la reacție acidă pentru eliberarea acidului uric. După neutralizarea soluției cu un amestec de soluții de borax și NaHCO₃ (1:1) se pun 2 picături de soluție de amidon și se titreză cu soluție de iod până la virajul culorii la albastru.

Calculul rezultatelor

Conținutul de acid uric se calculează conform ecuației:

$$\text{g acid uric/1000 mL urină} = V \times 0,84 \quad (3.3)$$

unde:

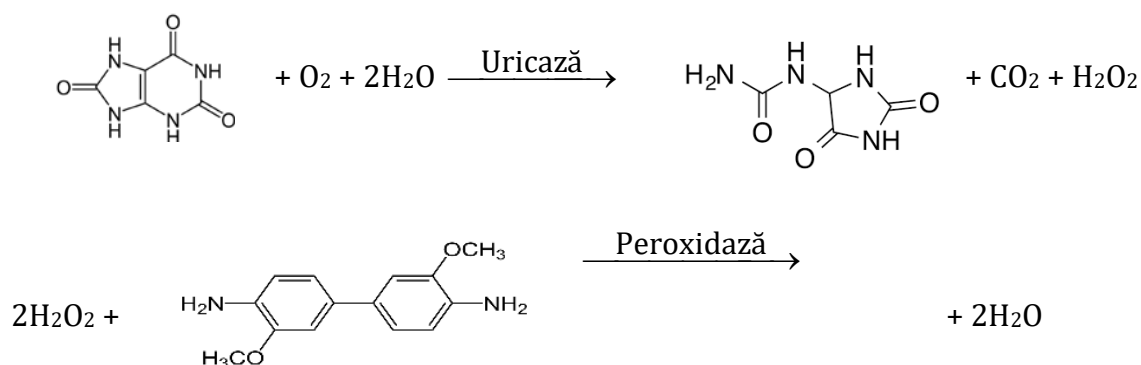
V - volumul soluției de iod 0,1 N folosit la titrare, mL

0,84 – factor de corecție

Dozarea enzimatică a acidului uric urinar

Principiul metodei

Metoda are la bază oxidarea acidului uric în prezența uricazei la alantoină, CO₂ și apă oxigenată. Apa oxigenată formată reacționează, în prezența peroxidazei, cu forma redusă incoloră a o-dianisidină cu formarea formei oxidate a o-dianisidină de culoare galbenă (Dronca și colab., 2014).



Aparatură și reactivi

- Urină diluată 1:10
- Soluție standard de acid uric 0,05 g/1500 mL
- Amestec de enzime: uricază 0,1 U/mL + peroxidază 33 U/mL
- o-dianisidină 1% în alcool etilic
- Spectrometru UV-VIS
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

În trei eprubete, se pregătesc soluțiile prezentate în Tabelul 3.11.

Tabelul 3.11. Dozarea enzimatică a acidului uric urinar

Reactiv	Blank	Standard	Proba de analizat
Urină diluată 1:10	-	-	0,2 mL
Standard acid uric	-	0,2 mL	-
Apă distilată	0,2 mL	-	-
Amestec de enzime	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL
o-dianisidină	4 mL	4 mL	4 mL
Omogenizarea și incubarea la temperatura camerei 15 minute Se citesc absorbanțele probei și standardului la 520 nm			
Absorbanța	-		

Calculul rezultatelor

$$\text{Acid uric (g/1500 mL)} = \frac{\text{Abs_proba} * \text{Conc_standard}}{\text{Abs_standard}} * F_{\text{dilutie}} \quad (3.4)$$

$$\text{Acid uric (g/1500 mL)} = \frac{\text{Abs_proba}}{\text{Abs_standard}} * 0,05 * 10 = \frac{\text{Abs_proba}}{\text{Abs_standard}} * 0,5 \quad (3.5)$$

unde:

Abs_proba – absorbanta probei de analizat, adim

Abs_standard – absorbanta standardului, adim

Conc_standard – concentrația standardului, 0,05 g/1500 mL

Factor de diluție – factorul de diluție

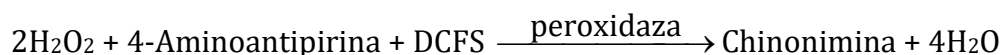
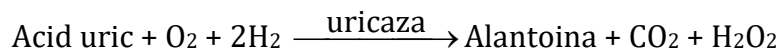
Observații

-intervalul de referință este 0,25 – 0,75 g/24 ore

-valori mai mari decât intervalul de referință sunt asociate gutei

Dozarea acidului uric urinar cu spectrofotometrul BioSystems BTS-350**Principiul metodei**

Metoda are la bază oxidarea acidului uric în prezența uricazei la alantoină, CO₂ și apă oxigenată. Apa oxigenată formată reacționează, în prezența peroxidazei, cu 4-aminoantipirina cu formare de chinonimină de culoare roșie (Prospect BioSystems – Acid uric – Uricază/Peroxidază). Intensitatea culorii este direct proporțională cu concentrația acidului uric din proba analizată.

**Aparatură și reactivi**

- Urină, ser, plasmă; urina se diluează 1/10 cu apă distilată înainte de măsurarea concentrației; acidul uric în ser sau plasmă este stabil 7 zile la 2-8°C (se pot folosi heparină, oxalat sau florură ca anticoagulanți); acidul uric din urină este stabil 4 zile la temperatura camerei dacă pH-ul este ajustat la valori > 8 cu NaOH; nu se refrigerază urina

- Reactiv de culoare (A): fosfat 100 mmol/L, detergent 1,5 g/L, diclorfenilfosfat 4 mmol/L, uricază > 0,12 U/mL, ascorbat oxidaza > 5 U/mL, peroxidaza > 1 mL, 4-aminoantipirina 0,5 mmol/L, pH 7,8

- Standard de acid uric (S): acid uric 6 mg/dL

- Urină de control biochimică – nivel I (normal) – se reconstituie prin adăugarea de 5 mL apă distilată, se lasă 30 minute la temperatura camerei

- Urină de control biochimică – nivel II (patologic) - se reconstituie prin adăugarea de 5 mL apă distilată, se menține 30 minute la temperatura camerei

- Echipament BioSystems BTS

- Baie de apă termostată

- Sticlărie de laborator

Mod de lucru (cf. Prospect BioSystems – Acid uric – Uricază/Peroxidază)

A. Pregătirea soluțiilor: se prepară soluțiile prezentate în Tabelul 3.12 (Figura 3.1)

Tabelul 3.12. Pregătirea soluțiilor pentru dozarea acidului uric

Reactiv	Blank	Standard	Control I (normal)	Control II (patologic)	Proba de analizat
Apă distilată	25 μ L	-	-	-	-
Standard de acid uric (S)	-	25 μ L	-	-	-
Urină de control biochimică – nivel I (normal)	-	-	25 μ L	-	-
Urină de control biochimică – nivel II (patologic)	-	-	-	25 μ L	-
Proba de analizat	-	-	-	-	25 μ L
Reactiv de culoare (A)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	1, mL
Omogenizare și incubare 10 minute la 16-25°C sau 5 minute la 37°C					
Absorbanța standardului și probei la 520 nm	-	A _S	A _{C I}	A _{C II}	A _P

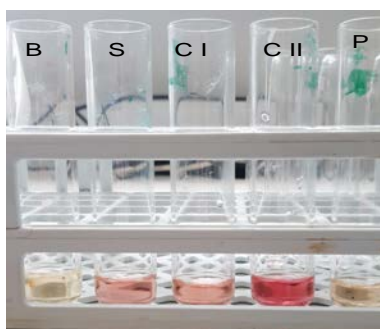


Figura 3.1. Soluții pregătite pentru dozarea acidului uric

B – blank, S – standard, C I – control I (normal), C II – control II (patologic), P - probă

B. Utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350:

B.1. Introducerea/Verificarea metodei de analiză -introduce/ verifică parametrii specifici analizării analitului: concentrațiile standardelor, blank, controlul, liniaritatea metodei, numărul de replici, unitatea de măsură, lungimea de undă folosită la citire, etc.

B.2. Măsurarea concentrației analitului investigat în probe - citește absorbanta probelor și standardului în raport cu blank-ul și afișează rezultatul.

În Anexa 3.1. se exemplifică utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350 la analiza acidului uric urinar.

Calculul rezultatelor

$$\text{Concentrație acid uric} = \frac{A_{\text{Proba}}}{A_{\text{Standard}}} \times C_{\text{Standard}} \times \text{factor de dilutie} = C_{\text{proba}} \quad (3.6)$$

	Ser sau plasma	Urina
$\frac{A_{\text{proba}}}{A_{\text{standard}}}$	x 6 = mg/dL acid uric	x 60 = mg/dL acid uric
	x 357 = $\mu\text{mol/L}$ acid uric	x 3570 = $\mu\text{mol/L}$ acid uric

Valori de referință (valori orientative)

Ser și plasmă:

Bărbații: 3,5 – 7,2 mg/dL = 210 – 420 $\mu\text{mol/L}$

Femei: 2,6 – 6,0 mg/dL

Urină:

250 – 270 mg/24 ore = 1,5 – 4,5 mmol/24 h.

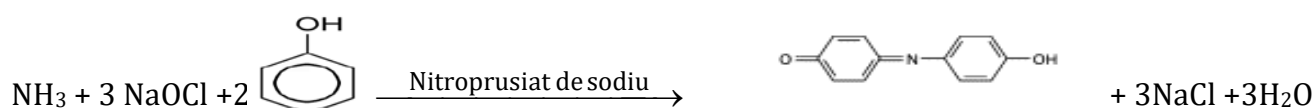
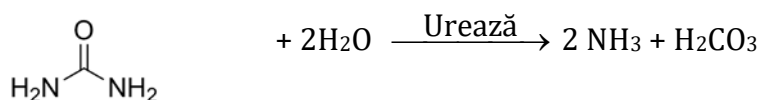
Dozarea ureei**Aspecte generale**

Urea este sintetizată la nivelul ficatului (ureogeneză) din CO_2 și NH_3 și eliberată în sânge de unde este transportată prin intermediul plasmiei la rinichi. Filtrarea glomerulară elimină aproximativ 60% din uree, iar restul se reabsorbe prin difuzie pasivă prin tubii renali, sau este excretată prin tractul gastrointestinal și piele.

Dozarea ureei - Metoda Berthelot

Principiul metodei

Metoda are la bază descompunerea enzimatică a ureei până la amoniac și implicarea acestuia într-o reacție cu fenol și hipoclorit de sodiu în prezența nitroprusiatului de sodiu cu formarea unui complex colorat în albastru (indofenol) (Dronca și colab., 2014).



Aparatură și reactivi

- Urină diluată 1:10m:
- Suspensie de urează 0,5 mg/mL
- Soluție standard de uree: 0,3 g/1500 mL
- Reactiv de culoare 1: Fenol 150 mM + nitroprusiat de sodiu 0,47 mM
- Reactiv de culoare 2: hipoclorit de sodiu 13 mM în NaOH 130 mM
- Spectrometru UV-VIS
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

Se pregătesc soluțiile din Tabelul 3.13.

Tabelul 3.13. Compoziția soluțiilor pentru dozarea ureei

Reactiv	Blank	Standard	Proba de analizat
Suspensie urează	0,1 mL	0,1 mL	0,1 mL
Standard uree	-	0,1 mL	-
Urină diluată	-	-	0,1 mL
Apă distilată	0,1 mL	-	-
Omogenizare și incubare timp de 30 de minute la temperatura camerei. Se citesc absorbantele probelor la 620 nm			
Absorbanța	-	A _S	A _P

Calcul rezultatelor

$$\text{Uree (g/1500 mL)} = \frac{A_P * \text{Conc_standard}}{A_S} * F_{\text{dilutie}} \quad (3.7)$$

$$\text{Uree (g/1500 mL)} = \frac{A_P}{A_S} * 0,3 * 100 = \frac{A_P}{A_S} * 30 \quad (3.8)$$

unde:

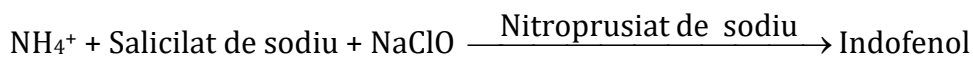
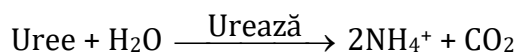
Fdilutie – factorul de diluție

Observații

- intervalul de referință este 20 – 55 g/24 ore
- valori mai mari decât intervalul de referință sunt asociate unui catabolism proteic exagerat
- valori mai mici decât intervalul de referință apar în afecțiuni renale care evoluează cu insuficiență renală, inaniție, afecțiuni hepatice, etc.

Dozarea ureei/BUN cu spectrofotometrul BioSystems BTS-350**Principiul metodei**

Metoda are la bază descompunerea ureei în prezența ureazei până la ioni de amoniu care în prezența salicilatului de sodiu, hipocloritului de sodiu și nitroprusiatului formează indofenol - un complex colorat în verde a cărui intensitate este proporțională cu concentrația ureei (Prospect Urea/Bun color – BioSystems).



Porțiunea azotată a ureei se notează cu BUN.

Aparatură și reactivi

- Urină, ser, plasmă colectate prin procedurile standard; Urina se diluează 1/50 cu apă distilată înainte de utilizare

- Reactiv A1: Salicilat de sodiu 62 mmol/L, nitroprusiat de sodiu 3,4 mmol/L, buffer fosfat 20 mmol/L, pH 6,9

- Reactiv A2: urează > 500 U/mL

- Reactiv A: se transferă conținutul vasului cu reactiv A2 în vasul cu reactiv A1; pentru cantități mai reduse, proporția este de 1 mL reactiv A2 + 24 mL reactiv A1

- Reactiv B: Hipoclorit de sodiu 7 mmol/L, hidroxid de sodiu 150 mmol/L
- Standard glucoză/uree/creatinină: Glucoză 100 mg/dL, uree 50 mg/dL (8,3 mmol/L BUN 23,3 mg/dL), creatinină 2 mg/dL (soluție apoasă)
- Urină de control biochimică – nivel I (normal) – se reconstituie prin adăugarea de 5 mL apă distilată, se păstrează 30 minute la temperatura camerei
- Urină de control biochimică – nivel II (patologic) - se reconstituie prin adăugarea de 5 mL apă distilată, se lasă 30 minute la temperatura camerei
- Echipament BioSystems BTS
- Baie de apă termostată
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru (cf. Prospect BioSystems – Uree)

A. Pregătirea soluțiilor: se prepară soluțiile prezentate în Tabelul 3.14 (Figura 3.2).

Tabelul 3.14. Compoziția soluțiilor pentru analiza ureei/BUN

Reactiv	Blank	Standard	Control I (normal)	Control II (patologic)	Proba de analizat
Standard uree (S)	-	10 μ L	-	-	-
Probă	-	-	-	-	10 μ L
Urină de control biochimică – nivel I (normal)	-	-	10 μ L	-	-
Urină de control biochimică – nivel II (patologic)	-	-	-	10 μ L	-
Reactiv A	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
Omogenizare intensă, incubare timp de 10 minute la 16-25° sau 5 minute la 37°C					
Reactiv B	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL	1.0 mL
Omogenizare intensă, incubare timp de 10 minute la 16-25°C sau 5 minute la 37°C					
Absorbanța la 600 nm	-	As	ACI	ACII	AP

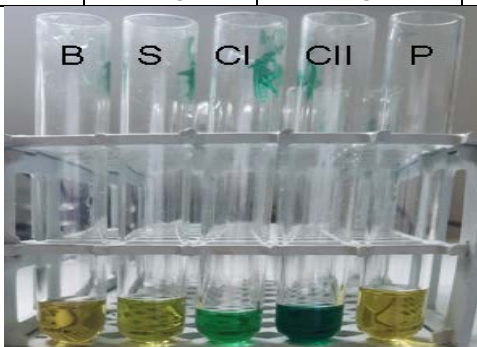


Figura 3.2. Soluții pregătite pentru dozarea ureei

B – blank, S – standard, CI – control I (normal), CII – control II (patologic), P - probă

B. Utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350:

B.1. Introducerea/Verificarea metodei de analiză -introduce/ verifică parametrii specifici analizării analitului: concentrațiile standardelor, blank, controlul, liniaritatea metodei, numărul de replici, unitatea de măsură, lungimea de undă folosită la citire, etc.

B.2. Măsurarea concentrației analitului investigat în probe – citește absorbanțele probelor și standardului în raport cu blank-ul, afișează rezultatul.

În Anexa 3.1. se exemplifică utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350 la analiza acidului uric urinar. Pentru analiza ureei se parcurg aceiași pași, alegând din meniurile *Programare* și *Concentrații* metoda pentru Uree.

Calcul rezultatelor

$$\text{Uree (mg/dL)} = \frac{A_P * \text{Conc_standard}}{A_S} * F_{\text{diluție}} \quad (3.9)$$

$$\text{Uree (mg/mL)} = \frac{A_P}{A_S} * 0,3 * 100 = \frac{A_P}{A_S} * 30 \quad (3.10)$$

unde:

Fdiluție – factorul de diluție

În cazul utilizării standardului cu 50 mg/dL uree, rezultatele se vor calcula astfel:

	Ser și plasmă	Urină
$\frac{\text{Abs_probă}}{\text{Abs_standard}}$	X 50 = mg/dL X 23,3 = mg/dL BUN X 8,3 = mmol/L uree	X 2500 = mg/dL X 1165 = mg/dL BUN X 415 = mmol/L uree

Observații

- Concentrații de referință orientative:
- Ser și plasmă: 12,8 – 42,8 mg/dL uree = 6 – 20 mg/dL BUN = 2,14 – 7,14 mmol/L uree; concentrațiile sunt mai mici în perioada neonatală, iar la adulți peste 60 de ani sunt mai mari decât la adulți; concentrațiile la bărbați sunt ceva mai mari decât la femei;
- Urină: 26 – 43 mg/24-h uree = 12 – 20 g/24 h BUN = 428 – 714 mmol/24-h uree.
- Concentrații mai ridicate apar în: diete bogate în proteine, catabolism proteic ridicat, hemoragii gastrointestinale, deshidratări medii, tratament cu glucocorticoizi, probleme cardiovasculare.

- Uremia post-renală apare și ca urmare a unor factori care obstrucționează fluxul urinar (tumori sau hipertrofii ale prostatei); din acest motiv, utilizarea concentrației de uree ca indicator renal este limitată din cauza factorilor non-renali.

Dozarea creatinei și creatininei urinare

Aspecte generale

Creatina este sintetizată în ficat și parțial transportată prin intermediul plasmei la țesuturile musculare și creier, transformată în fosfocreatină și folosită ca sursă de energie. O altă parte este filtrată la nivel glomerular și reabsorbită, iar o altă parte eliminată în urină. Valorile concentrației creatininei urinare din 24 ore poate oferi o evaluare a funcției renale, sau intervin în raportarea concentrației altor metaboliți urinari (calciu urinar/creatinină urinară, albumină urinară/creatinină urinară, acid vanil mandelic urinar/ creatinină urinară) (Fischbach (d), 2009).

Creatinina rezultă prin conversia spontană a creatinei (sau fosfocreatinei) și nu poate fi utilizată de către organism, motiv pentru care este eliminată complet în urină. Nivelul creatininei în urină este un parametru important în evaluarea funcției renale și monitorizarea dializei renale (clearance-ului renal: rata filtrării glomerulare, RFG).

Dozarea creatinei și creatininei urinare - Metoda Jaffe

Principiul lucrării

Metoda are la bază condensarea creatininei cu acidul picric în mediu puternic alcalin cu formarea picratului de creatinină (reacția Jaffe) un compus colorat a cărei intensitate se determină fotometric (Pintea și colab., 2008).

Pentru dozarea creatinei se folosește tehnica transformării creatinei în creatinină, dozarea creatinei totale și apoi a creatinei prin diferență. Dezavantajul metodei constă în faptul că nu este specifică pentru creatinină, prezența acetonei, acidului ascorbic sau a cefalosporinelor conducând la rezultate fals pozitive.

Aparatură și echipamente

- Urină:

a) urina din 24 ore: la ora 7 dimineață pacientul urinează dar nu păstrează această urină; toate emisiunile de urină pe durata a 24 de ore apoi colectează într-un vas curat, se omogenizează

urina recoltată, se măsoară volumul acesteia și din acesta se rețin 100 mL

b) o probă de urină spontană (preferabil prima urină de dimineață)

- Soluție de acid picric 0,04 M

- Soluție de NaOH 0,75M

- Soluție standard de creatinină 1 mg/dL (se poate înlocui cu soluție etalon de $K_2Cr_2O_7$: 24,54 g $K_2Cr_2O_7$ uscat se dizolvă în 1 L apă distilată)

- Spectrometru UV-VIS

- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

A. Dozarea creatininei inițiale: se pregătesc soluțiile din Tabelul 3.15.

Tabelul 3.15. Compoziția soluțiilor pentru dozarea creatininei inițiale.

Reactiv	Blank	Standard	Proba de analizat
Urină diluată 1:10	-	-	3 mL
Standard creatinină (sau soluția etalon de $K_2Cr_2O_7$)	-	3 mL	-
Apă distilată	3 mL	-	-
Acid picric	1	1	1
NaOH	1	1	1
Omogenizare și incubare la temperatura camerei timp de 20 minute. Se citesc absorbânțele probelor la 520 nm			
Absorbanța	-	Abs_proba	Abs_standard

B. Dozarea creatininei totale

Într-un balon Erlenmayer prevăzut cu refrigerent Ostrogovich se introduc 2 mL urină, 1 mL soluție HCl și se încălzește 2-3 ore pe baia de apă la fierbere pentru transformarea creatinei eventual existente în urină. După răcire, se repetă protocolul de analiză de la punctul A, calculându-se Creatinina urinară totală.

Calculul rezultatelor

Conținutul de creatinină inițială se determină cu relația:

$$\text{Creatinină urinară inițială (g/100 mL)} = \frac{\text{Abs_proba} * \text{Conc_standard}}{\text{Abs_standard}} * F_{\text{dilutie}} \quad (3.11)$$

$$\text{Creatinină urinară inițială (g/100 mL)} = \frac{\text{Abs_proba}}{\text{Abs_standard}} * 1,5 \quad (3.12)$$

unde:

Abs_proba – absorbanța probei de analizat, adim

Abs_standard – absorbanța standardului, adim

Conc_standard – concentrația standardului, g/100 mL

Fdiluție – factorul de diluție

Conținutul de creatină se determină cu relația:

$$\text{g creatină/100 mL urină} = \text{Creatinină totală} - \text{Creatinina inițială} \quad (3.13)$$

Dozarea creatininei urinare folosind spectrofotometrul BioSystems BTS-350

Principiul lucrării

Metoda are la bază reacția dintre creatinină și acidul picric în mediu alcalin cu formarea unui complex colorat galben-roșu a cărui intensitate se citește spectrofotometric (Metoda Jaffé). În cazul serului și a plasmii, proteinele pot reacționa în mod nespecific. Pentru corecție, se scade din rezultatul final o valoare constantă, utilizarea acestei corecții purtând numele de *metoda Jaffé compensată*.

Aparatură și echipamente

- Ser, plasmă, urină colectate prin proceduri standard; în cazul urinei se face diluție 1/50
- Reactiv A: NaOH 0.4 mol/L, detergent
- Reactiv B: acid picric 25 mmol/L
- Reactiv de lucru: se amestecă volume egale de reactiv A și reactiv B și se omogenizează
- Standard: standard de glucoză/uree/creatinină: glucoză 100 mg/dL, urea 50 mg/dL, creatinină 2 mg/dL în apă
- Ser control biochimie nivel I (normal)
- Ser control biochimie nivel II (patologic)
- Ser control biochimie urină nivel I (normal)
- Ser control biochimie urină nivel II (patologic)
- Spectrofotometru BioSystems BTS-350
- Baie de apă
- Sticlărie de laborator

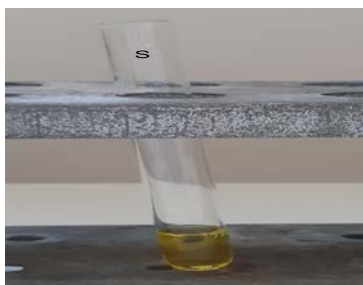
Mod de lucru (cf. Prospect BioSystems – Creatinine)

A. Pregătirea soluțiilor: se prepară soluțiile prezentate în Tabelul 3.16 (Figura 3.3).

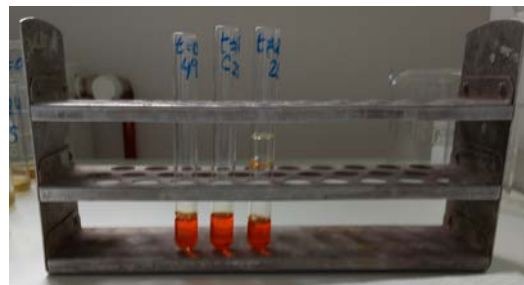
Tabelul 3.16. Compoziția soluțiilor pentru analiza creatininei urinare

Reactiv	Standard	Control I (normal)	Control II (patologic)	Proba de analizat
Standard	0,1 mL	-	-	-
Reactiv de lucru	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Control I	-	0,1 mL	-	-
Control II	-	-	0,1 mL	-
Probă	-	-	-	0,1 mL
Omogenizare				
Absorbanța după 30 s	A _{1S}	A _{1CI}	A _{1CII}	A _{1P}
Absorbanța după alte 90 s	A _{2S}	A _{2CII}	A _{2CII}	A _{2P}

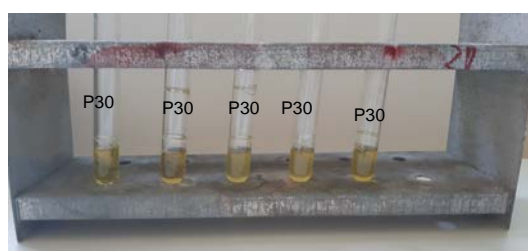
Obs. nediluarea urinei conduce la probe colorate foarte intens (Figura 3.3.b) a căror absorbanță iese din intervalul corespunzător dreptei de calibrare.



a. Standardul



b. Dozare creatinină în urină nediluată



c. Dozare creatinină în urină diluată

Figura 3.3. Dozarea creatininei urinare

S – standard, P30 – probe la 30 secunde, P90- probe la 90 secunde

B. Utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350:

B.1. Introducerea/Verificarea metodei de analiză -introduce/ verifică parametrii specifici analizării analitului: concentrațiile standardelor, blank, controlul, liniaritatea metodei, numărul de replici, unitatea de măsură, lungimea de undă folosită la citire, etc.

B.2. Măsurarea concentrației analitului investigat în probea – citește absorbanțelor probelor și standardului în raport cu blank-ul, afișează rezultatul.

În Anexa 3.1. se exemplifică utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350 la analiza acidului uric urinar. Pentru dozarea ureei se parcurg aceleași etape, alegând din meniurile *Programare* și *Concentrații* metoda pentru Creatinină.

Calcul rezultatelor

Concentrația de creatinină se calculează cu relația:

$$\text{Conc. creatinină} = \frac{(A_{2P} - A_{1P})}{(A_{2S} - A_{1S})} \times C_{\text{standard}} \times \text{Factor de dilutie} - \text{Factor de corectie} \quad (3.14)$$

În cazul folosirii standardului de creatinină cu concentrația 2 mg/dL, relația devine:

	Ser și plasmă		Urină
	Metoda Jaffé necompensată	Metoda Jaffé compensată	
$\frac{(A_{2P} - A_{1P})}{(A_{2S} - A_{1S})}$	x 2] = mg/dL x 177] = μmol/dL	X 2] - 0.37 = mg/dL X 177] - 33 = μmol/dL	x 100] = mg/dL x 8840] = μmol/dL

Observații

-valori de referință orientative:

Ser și plasmă

	Metoda Jaffé necompensată	Metoda Jaffé compensată
Bărbați	0,9 - 1,3 mg/dL = 80 - 115 μmol/dL	0,7 - 1,2 mg/dL = 62 - 106 μmol/dL
Femei	0,6 - 1,1 mg/dL = 53 - 97 μmol/dL	0,5 - 0,5 mg/dL = 44 - 80 μmol/dL

Urină

- bărbați 14 - 26 mg/Kg/24h = 124 - 230 μmol/Kg/24h
- femei 11 - 20 mg/Kg/24h = 97 - 177 μmol/Kg/24h

Clearance creatininic

Aspecte generale

Noțiunea de "Clearance" (rata filtrării glomerulare, RFG) reprezintă volumul de plasmă (mL) care poate fi complet epurat de o anumită substanță (uree, medicamente) în unitatea de timp (un minut). Pentru măsurarea clearance-lui glomerular se folosesc compuși filtrați liberi de rinichi și

nereabsorbiți sau secretați la nivel tubular (ex. creatinina). Acest parametru reprezintă un indicator foarte bun al funcției glomerulare de filtrare.

Pentru a putea calcula RFG corespunzătoare unui anumit compus, trebuie să se cunoască concentrația acestuia în ser (C_S mg/mL), în urină (C_U mg/mL) și în debitul urinar (C_D ml/min).

RFG se calculează cu relația:

$$\text{RFG (mL/min)} = \frac{C_U}{C_S} * C_D \quad (3.15)$$

Principiul metodei

Metoda are la bază raportarea creatinuriei (conținutul de creatină din urină) la creatinemie (conținutul de creatine din sânge) și raportarea la debitul urinar,

Mod de lucru

Se determină creatinuria și creatinina serică (creatinemia).

Calculul rezultatelor

$$\text{Clearance creatinic} = \frac{\text{mg creatină urinară} / \text{min}}{\text{mg creatină serică} / \text{mL}} * \text{Debit urinar (mL/min)} \quad (3.16)$$

Observații

- se consideră în calcul Debitul urinar normal: 1,5 L/24 ore sau 1,024 mL/min
- intervalul de referință: 75 – 160 mL/min, cu media de 120 mL/min
- valori < 75 mL/min indică rate de filtrare glomerulară reduse (insuficiență cardiacă, hemoragii masive, boli renale, etc.)

Dozarea elementelor minerale în urină (Ionograma urinii)

Aspecte generale

Organismul are capacitatea de a regla compoziția în elemente minerale a sângelui eliminând surplusul prin urină. În cazul în care funcția rinichiului este alterată elementele minerale nu se pot elimina și se acumulează excesiv în organism.

Dozarea clorului urinar - Metoda Mohr

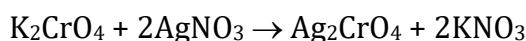
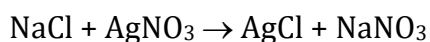
Aspecte generale

Clorul este un electrolit de bază în sânge cu rol în menținerea volumului, presiunii și pH-ului sângelui și menținerea echilibrului dintre fluidele din interiorul și exteriorul celulelor.

Calea principală de eliminare a clorului din organism este cea renală, mișcările ionului de sodiu fiind urmate de cele ale clorului, proporțional și pasiv, la nivelul tuturor segmentelor nefronului. Excreția renală a Cl^- este proporțională cu aportul din 24h (Fischbach (d), 2009).

Principiul metodei

Clorul urinar precipită sub formă de AgCl în mediu neutru sau slab acid prin titrare cu AgNO_3 având K_2CrO_4 ca indicator. Atunci când întreaga cantitate de clor din sistem a fost precipitată se formează precipitatul de Ag_2CrO_4 (culoare roșie-cărămizie):



Ca variantă alternativă se poate aplica metoda potențimetrică cu ion selectiv (titrarea folosind ca electrod de referință electrodul de platină și un electrod de măsură Ag/AgCl).

Aparatură și reactivi

- Urină: a) urina din 24 ore: la ora 7 dimineață pacientul urinează dar nu păstrează această urină; toate emisiunile de urină pe durata a 24 de ore apoi colectează într-un vas curat, se omogenizează urina recoltată, se măsoară volumul acesteia și din acesta se rețin 100 mL; b) o proba de urină spontană (preferabil prima urină de dimineată)

- Soluție AgNO_3 29,06 g/1000 mL apă distilată (1 mL de soluție corespunde la 0,01 g NaCl)
- Soluție K_2CrO_4 10%
- Soluție NaOH N/10
- Hârtie de turnesol
- Instalație de titrare
- Electrod de platină (referință), electrod Ag/AgCl
- Voltmetru
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru**A. Metoda Mohr**

Un volum exact de 10 mL urină se neutralizează cu NaOH (verificare cu hârtie de turnesol) și se aduce la volum de 100 mL cu apă distilată. Pentru dozare se iau câte 3 probe a 10 mL, se adaugă 2-3 picături de K_2CrO_4 și se titrează cu $AgNO_3$ până la apariția unei colorații roșii-cărămizii care nu dispare la agitare. Se citește volumul soluției de $AgNO_3$ folosit la titrare.

B. Titrare potențiometrică

Peste 10 mL urină se adaugă soluție de NaOH până la reacție neutră (verificare cu hârtie de turnesol) și se aduce la volum de 100 mL cu apă distilată. Pentru dozare se iau câte 3 probe a 10 mL, se inserează electrozii și voltmetrul, se titrează picătură cu picătură cu soluție de $AgNO_3$ și se citește valoarea potențialului. Se reprezintă grafic valoarea diferenței de potențial dintre cei doi electrozi în funcție de volumul de titrant adăugat. Din curbă se determină volumul de echivalență.

Calculul rezultatelor:

Conținutul de clorură în urină se calculează cu ecuația ($1 \text{ mL } AgNO_3 = 0,01 \text{ g NaCl}$):

$$\text{g NaCl}/100 \text{ mL urină} = V \cdot 0,01 \cdot 10 \cdot 100 \quad (3.17)$$

unde:

V – volumul soluției de $AgNO_3$ cu care s-a titrat sau volumul la echivalență, mL

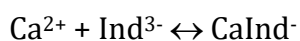
0,01 – conținutul de NaCl corespunzând la 1 ml soluției de $AgNO_3$, mg

10 – factor de diluție

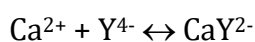
100 – volumul de urină la care se raportează rezultatul, mL

Dozarea complexonometrică a Calciului urinar**Principiul metodei**

Metoda constă în titrarea ionilor de Ca^{2+} din urină în mediu puternic bazic cu complexon III (EDTA - sarea de sodiu a acidului etilen-diamino-tetraacetic) în prezență de murexid (Viman și Mihaly Cozmuța, 1994):

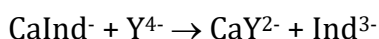


Roz



Complexonul
deprotonat

Reacția care determină virajul indicatorului:



Violet

Aparatură și reactivi

- Urină proaspătă fără conservanți; urina colectată se supune acidificării pentru a evita precipitării sărurilor de calciu
- Soluție de complexon III 0,001N de factor cunoscut (F_{EDTA}): 1 mL soluție complexează 0,2 mg Ca^{2+}
- NaOH 9N
- Indicator Murexid 0,1% (murexid solid + NaCl solid 1:1000)
- Instalație de titrare, sticlărie de laborator

Mod de lucru

Se pregătesc două probe conform Tabelului 3.17:

Tabelul 3.17. Compoziția soluțiilor pentru dozarea complexometrică a calciului urinar

Reactivi	Probă	Blank
Urină, mL	2	-
Apă distilată, mL	50	52
Soluție NaOH, mL	0,2	0,2
Indicator murexid, picături	2	2
Titrare cu EDTA până la virajul culorii	V_1 Roz	V_2 Roz-violaceu

Calculul rezultatelor

1 mL EDTA 0,001 N.....0,2 mg Ca^{2+}

$(V_1 - V_2)F_{\text{EDTA}}$ mL EDTA 0,001NX mg Ca^{2+}

$$X = 0,2 \cdot (V_1 - V_2) \cdot F_{\text{EDTA}} \text{ mg } \text{Ca}^{2+} / 2 \text{ mL urină} \quad (3.18)$$

Concentrația de Ca se raportează la urina de 24 ore (1500 mL/24 ore):

$$\text{g } \text{Ca}^{2+} / \text{urină } 24 \text{ h} = 0,2 \cdot 1500 \cdot 10^{-3} (V_1 - V_2) \cdot F_{\text{EDTA}} \quad (3.19)$$

Dozarea elementelor minerale din urină prin spectrometrie de absorbție atomică

Principiul metodei

Metoda are la bază digestia probelor biologice (sânge, urină, oase, etc) până la stadiul de cenușă, solubilizarea cenușii și citirea concentrației elementelor minerale cu spectrofometrul de absorbție atomică la lungimile de undă specifice.

Aparatură și reactivi

- Probe biologice (urină, sânge, oase, etc)
- HNO₃ 65%
- Cuptor de digestie a probelor (Berghof) sau cuptor de calcinare
- Spectrometru de absorbție atomică
- Standarde ale elementelor minerale analizate
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

A. Digestia probelor folosind cuptorul de digestie Berghof (Berghof, V 6.0)

250 μL probă biologică lichidă (urină, sânge) sau 0,5 g probă biologică solidă (oase, dinți) se introduc în tubul de digestie și se adaugă 1,25 mL HNO₃. Se setează programul de digestie:

Tabelul 3.18. Digestia probelor biologice lichide (Berghof, V 6.0)

Pasul	1	2	3	4
Temperatura, °C	130	155	170	100
Puterea, W	80	80	80	20
Timp, minute	8	5	12	5

Tabelul 3.19. Digestia probelor biologice solide (Berghof, V 6.0)

Pasul	1	2	3
Temperatura, °C	60	80	95
Puterea, W	80	80	80
Timp, minute	10	10	10
Răcire până la temperatura camerei și diluție cu apă distilată.			

B. Digestia probelor folosind cuptorul de calcinare

0,5 mL probă lichidă sau 5 g probă solidă se supun calcinării la temperatura de 550°C timp de 8 ore. Cenușa rezultată se dizolvă în 15 mL HNO₃ și se diluează cu apă distilată la 25 mL.

C. Citirea concentrațiilor la spectrometrul de absorbție atomică

Concentrațiile elementelor minerale din soluțiile rezultate se citesc folosind spectrometrul de absorbție atomică, calibrat în prealabil.

D. Prezentarea rezultatelor experimentale

Rezultatelor experimentale se raportează ca mg element/mL probă lichidă sau mg element/g probă solidă ținând cont de volumele/masele de probe folosite în analiză și diluții.

Dozarea iodometrică a acidului ascorbic din urină - Metoda Palladins

Aspecte generale

Vitamina C (acidul ascorbic) este o vitamină hidrosolubilă cu rol în producția de hormoni suprarenali (glucocorticosteroidi), al acidului folic, în metabolismul colagenului, al anumitor neurotransmițători și al tirozinei. Este un agent antioxidant puternic care contribuie la detoxifierea enzimatică a ficatului, facilitează absorbția fierului în tubul digestiv, neutralizează radicalii liberi și nitrozaminele cancerigene. Aportul ridicat de vitamina C în organism, de proveniență alimentară sau farmaceutică, poate conduce la rezultate false ale unor parametrii esențiali ai urinei (glucide, glucoză, nitriți, hemoglobină, bilirubină) ca urmare a interferenței în analiză compromițând astfel diagnosticul unor afecțiuni.

Principiul metodei

Acidul ascorbic se oxidează cu I_2 în mediu acid la acid dehidroascorbic folosind ca indicator amidonul care la finalul oxidării se colorează în albastru. Iodul folosit pentru oxidare se formează din reacția KIO_3 cu KI în mediu acid (Laborator Synevo (p), 2010; Mayo Clinic).

Aparatură și reactivi

- Sânge venos recoltat *à jeun* recoltat pe vacutainer ce conține anticoagulant (heparinat de litiu); nu se consumă alcool cu 24 ore înainte de recoltare; se separă plasma prin centrifugare, sau se congelează imediat; pentru protecția împotriva luminii se acoperă cu o folie de aluminiu; se resping de la analiză specișenele intens hemolizate, lipemice, sau neprotejate de lumină

- Urină spot congelată, protejată de contactul cu lumina
- Soluție HCl 2%
- Soluție KI 0,1N
- Soluție KIO_3 0,004N

- Soluție amidon 0,5%
- Instalație de titrare
- Sticlărie de laborator

Modul de lucru

10 mL probă aduc la volum de 50 mL cu soluție de HCl 2%, se omogenizează. După filtrare, un volum de 10 mL filtrat se amestecă cu 30 mL apă distilată, 5 mL soluție de KI și 5 mL HCl 2%. Se titrează cu soluția de KIO_3 în prezența amidonului ca indicator până la culoare albastră (care se menține 30 secunde). Se citește volumul de KIO_3 folosit la titrare (V).

Calculul rezultatelor

1 mL soluție KIO_3 0,004N 0,352 mg acid ascorbic (Macid ascorbic = 176 g/mol).

V mL soluție KIO_3 0,004 Nm mg acid ascorbic

$$\frac{m \text{ acid ascorbic (mg/10 mL probă)}}{0,352 \cdot V} = \frac{0,352 \cdot V}{0,352 \cdot V} \quad (3.20)$$

$$m \text{ acid ascorbic (mg/100 mL probă)} = 0,352 \cdot 10 \cdot V \quad (3.21)$$

(sau se raporteaza la volumul de urină eliminată în 24 h)

Observații

Valorile normale sunt de 50-150 $\mu\text{mol/zi}$ (10-30 mg/zi). Din punct de vedere clinic, variațiile lor nu sunt concludente și din acest motiv se folosește proba cu acid ascorbic. O cantitate de 100 mg acid acorbic se administrează intravenos, se recoltează urină timp de 5 ore, adăugând câte 10 mL acid acetic glacial la fiecare probă de urină. Se consideră că în condiții normale, se elimină în urină timp de 5 ore cel puțin 400 mg acid ascorbic. O excreție mai redusă sugerează hipovitaminoză sau avitaminoză C.

Dozarea proteinelor urinare folosind spectrofotometrul BioSystems BTS-350

Aspecte generale

Proteinele plasmatice sunt filtrare de către glomerulii renali (capilare) al căror rol este de a curăța sângele de toxine și metaboliți. La funcționare normală, glomerulii reabsorb cea mai mare parte a proteinelor care vor fi păstrate în sânge, în timp ce doar o mică parte este eliminată în urină. O funcționare improprie a glomerurilor se reflectă în creșterea concentrației proteinelor urinare. Procesul de filtrare este influențat de concentrația plasmatică și natura acestora. Proteinele care se regăsesc în mod general în urină sunt albumina (proporție majoritară),

glicoproteina Tamm Horsfall (secretată de către celulele tubulare renale, cu rol antibacterian și de inhibare a formării cristalelor de carbonat de calciu în urină) și globulinele plasmaticе.

Principiul lucrării

Metoda are la bază reacția în mediu acid dintre proteinele urinare și pirogalol rezultând un complex colorat în violet, a cărui intensitate este direct proporțională cu concentrația acestora.

Aparatură și reactivi

- Urină colectată prin metode standard; se colectează urina 24 h, se măsoară volumul și de depozitează 2-8 grade; stabil 7 zile la 4-8°C

- Lichid cefalorahidian recoltat prin proceduri standard (fără sânge); stabil 6 zile la 4-8°C

- Reactiv A: Roșu pirogalol 60 μmol/L, molibdat de sodium 40 μmol/L, succinat 50 mmol/L, pH 2,3, agent tensioactiv

- Standard proteine urinare (S): Albumină bovină

- Urină de control biochimică – nivel I (normal) – se reconstituie prin adăugarea de 5 mL apă distilată, se păstrează în repaos 30 minute

- Urină de control biochimică – nivel II (patologic) - se reconstituie prin adăugarea de unui volum de 5 mL apă distilată, se lasă timp de 30 minute la temperatura camerei

- Echipament BioSystems BTS

- Baie de apă termostată

- Sticlărie de laborator

Mod de lucru (cf. Prospect BioSystems – Protein (urine))

A. Pregătirea soluțiilor: se prepară soluțiile prezentate în Tabelul 3.20 (Figura 3.4).

Tabelul 3.20. Compoziția soluțiilor pentru analiza proteinelor urinare

Reactiv	Blank	Standard	Control I (normal)	Control II (patologic)	Proba de analizat
Apa distilată	20 μL	-	-	-	-
Standard proteine urinare (S)	-	20 μL	-	-	-
Proba	-	-	-	-	20 μL
Urină de control biochimică – nivel I	-	-	20 μL	-	-
Urină de control biochimică – nivel II	-	-	-	20 μL	-
Reactiv A	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Omogenizare intensă, incubare timp de 10 minute la 37°C					
Absorbanța la 600nm	-	As	ACI	ACII	AP

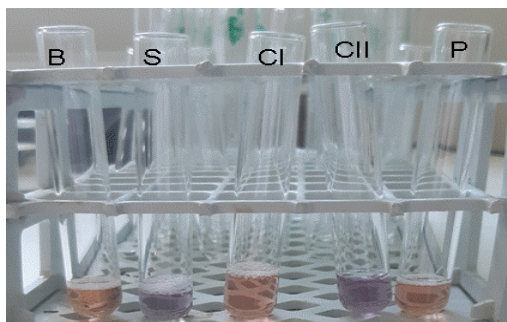


Figura 3.4. Soluții pregătite pentru dozarea proteinelor urinare

B – blank, S – standard, C I – control I (normal), C II – control II (patologic), P – probă

B. Utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350:

B.1. Introducerea/Verificarea metodei de analiză -introduce/ verifică parametrii specifici analizării analitului: concentrațiile standardelor, blank, controlul, liniaritatea metodei, numărul de replici, unitatea de măsură, lungimea de undă folosită la citire, etc.

B.2. Măsurarea concentrației analitului investigat în probe – citește absorbanțelor probelor și standardului în raport cu blank-ul, afișează rezultatul.

În Anexa 3.1. se exemplifică utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350 la analiza acidului uric urinar. Pentru dozarea proteinelor urinare se parcurg aceleași etape, selectând din meniurile *Programare* și *Concentrații* metoda pentru Proteine urinare.

Calculul rezultatelor

$$\text{Proteine urinare (mg/24h)} = \frac{A_P * \text{Conc_standard}}{A_S} * V_{\text{urină 24h}} \quad (3.22)$$

unde:

Conc_standard – concentrația standardului

$V_{\text{urină 24h}}$ - volumul de urină colectat pe durata a 24 h.

Observații

- Valori de referință orientative:

- Urină < 150 mg/24 h

- Lichid cefalorahidian: copii 300 – 1000 mg/L; adulți: 150 – 450 mg/L

- Proteinuria apare în majoritatea afecțiunilor renale; alte cauze care conduc la creșteri ale proteinuriei sunt: deshidratare, dietă bogată în proteine, stresul prelungit, reacții alergice, febră cu durată îndelungată, înfometare, consum de alcool, etc.

- În lichidul cefalorahidian, proteinuria apare ca urmare a presiunii craniene crescute (afectare craniană, tumori cerebrale, hemoragii intracerebrale) sau ca rezultat al unor infecții virale sau bacteriene (poliomielită, encefalită, meningită, etc.)

Identificarea rapidă a compușilor din urină cu ajutorul testelor rapide

Aspecte generale

Testele rapide implică folosirea **Strip-urilor (bandeletelor)**, benzi rigide de plastic în care reactivi specifici de identificare a componentelor din urină sunt impregnați pe diferite zone. Strip-urile se imersează în urină iar culorile apărute în diferite zone se citesc fie (i) cu ajutorul echipamentului de citire a strip-urilor, fie (ii) prin compararea vizuală cu tabelul de culori asociat strip-urilor. Testele rapide permit o identificare calitativă și semi-cantitativă a unor componente din urină: pH, leucocite, glucoză, acid uric, urobilinogen, proteine, nitriți, cetone, greutate specifică, sânge, etc.

Utilizarea analizorului automat URIPATH Reader 100 PLUS

(Urine Strips Reader) pentru analiza rapidă a urinei

Aspecte generale

URIPATH este un spectrofotometru de reflexie care analizează intensitatea culorilor reflectate de zona colorată și o raportează în unități medicale. Capul de citire al echipamentului conține o diodă emițătoare de lumină și o fotodiodă. Atunci când strip-ul, anterior imersat în urină, este amplasat în echipament, capul de citire emite radiație luminoasă pe întreaga lungime a acestuia. Fotodioda măsoară radiația luminoasă reflectată de fiecare zonă. Radiația este reflectată la o anumită lungime de undă care depinde de intensitatea culorilor de pe strip și implicit de concentrația componentului particular din urină. Fotodioda conține trei filtre, unul albastru (470 nm), unul verde (530 nm) și unul roșu (626 nm). Intensitatea luminoasă reflectată de fotodiodă este convertită în impulsuri electrice care apoi sunt transformate în unități medicale cu ajutorul unor tabele de conversie. URIPATH permite o analiză rapidă a urinei pentru identificarea urobilinogenului, glucozei, bilirubinei, cetonei, greutății specifice, sângelui, pH-ului, proteinelor, nitriților, acidului ascorbic și leucocitelor.

Aparatură și reactivi

- Urină colectată prin metode standard; se colectează urina 24 h, se măsoară volumul și se depozitează 2-8 grade; stabil 7 zile la 4-8°C

- Cititor de urină URIPATH
- Strip-uri compatibile cu sistemul URIPATH
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru:

Se imersează strip-ul în urină în așa fel încât toate câmpurile active ale acestuia să fie acoperite, se menține 1 secundă, se scoate și se introduce în analizor. Indicațiile echipamentului se transformă în unități medicale pe baza Tabelului 3.21 (URIPATH Reader 100 PLUS).

Tabel 3.21. Conversia afișajului URIPATH în unități medicale

ITEM	Printed Abbreviation							
	Conv	mg/dL	Normal	1	2	4	8	
Urobilinogen / URO	Conv	mg/dL	Normal	1	2	4	8	
	SI	μmol/L	Normal	16	33	66	131	
	Arb	E.U./dL	Norm.	1	2	4	8	
Glucose / GLU	Conv	mg/dL	Negative	100	250	500	1000	
	SI	mmol/L	Negative	5.5	14	28	55	
	Arb		Neg	+/-	+1	+2	+3	
Bilirubin / BIL	Conv	mg/dL	Negative	Small	Moderate	Large		
	SI	μmol/L	Negative					
	Arb		Neg	+1	+2	+3		
Ketones / KET	Conv	mg/dL	Negative	5	15	40	100	
	SI	mmol/L	Negative	0.5	1.5	3.9	10	
	Arb		Neg	+/-	+1	+2	+3	
Specific Gravity / SG	Conv./SI							
	Arb		1.000	1.005	1.010	1.015	1.020	1.025

Occult Blood / BLD	Conv		Neg	Trace	Small	Moderate	Large	
	SI	RBC/μL	Neg	5	10	50	250	
	Arb		Neg	+/-	+1	+2	+3	
pH / pH	Conv./SI		5	6	6.5	7	8	9
	Arb							
Protein / PRO	Conv	mg/dL	Neg	15	30	100	300	1000
	SI	g/L	Neg	0.15	0.3	1.0	3.0	10
	Arb		Neg	+/-	+1	+2	+3	+4
Nitrite / NIT	Conv./SI		Neg	Positive				
	Arb		Neg	+				
Leukocytes / LEU	Conv		Neg	Small	Moderate	Large		
	SI	WBC/μL	Neg	25	75	500		
	Arb		Neg	+1	+2	+3		
Ascorbic acid/AsA	Conv	mg/dL	Neg	20	40			
	SI	mmol/L	Neg	1.2	2.4			
	Arb		Neg	1+	2+			

Folosirea strip-urilor cu comparare vizuală pentru analiza urinii

Principiul metodei

Metoda implică compararea vizuală a culorilor care apar pe strip-ului imersat în urină cu tabelul de culori asociat strip-urilor.

Aparatură și reactivi

- Urină colectată prin metode standard; se colectează urina 24 h, se măsoară volumul și de depozitează 2-8 grade; stabil 7 zile la 4-8°C

- Strip-uri pentru analiza urinară
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru:

Se iversează strip-ul în urină în așa fel încât toate câmpurile active ale acestuia să fie acoperite, se menține 1 secundă, se scoate și se păstrează câteva secunde în aer pentru definitivarea culorii. Se compară vizual culorile afișate pe strip cu cele prezente în tabelul de culori de pe tubul de stocare a strip-urilor (Figura 3.5).

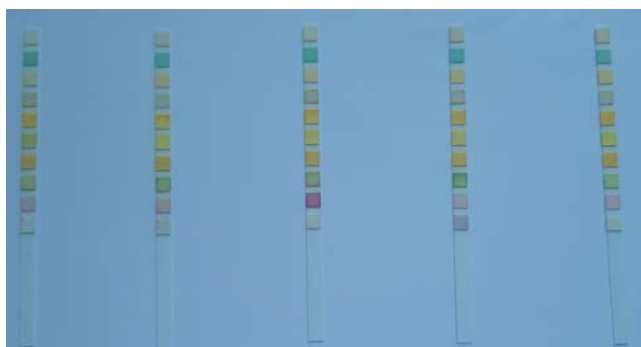


Figura 3.5. Analiza urinii folosind strip-urile urinare

Limite și interferențe la analiza urinii

Rezultatele analizei urinii pot fi fals pozitive sau fals negative din cauza modificărilor la care sunt supuși componenții urinari ca urmare a acțiunii unor factori (Tabel 3.22).

Tabel 3.22. Factori de interferență și influență la analiza urinii (Synevo cf. Fischbach, 2009; Walach(c), 2009; Dumitrașcu și colab., 2005)

Parametrul măsurat	Stabilitate în urină			Factori de influență	Factori de interferență
	-20°C	4-8°C	20-25°C		
Densitate	–	–	–	Ingestie de lichide, diuretice; precipitarea sărurilor modifică densitatea.	pH >7: ↓; resturi de detergenți din recipientul de colectare: ↑; medicamente – diuretice, antibiotice, substanțe radiologice de contrast (1.040-1.050), manitol, dextran: ↑
pH	Instabil	Instabil	Instabil	Dieta (carnată: ↓, vegetariană: ↑); crește în cazul formării amoniacului.	Clorura de amoniu, acid mandelic: ↓; bicarbonat de sodiu, citrat de potasiu, acetazolamida: ↑

Leucocite	–	1-4ore	1-4 ore	Secreții vaginale; Efort fizic intens: ↑; liză rapidă la densitate sub 1.010 și pH >7.	Culoarea intensă a urinei (bilirubină, nitrofurantoin): ↑; valori crescute ale glucozei și proteinelor urinare: ↓; unele antibiotice (imipenem, meropenem, acid clavulanic): ↑ sau ↓.
Proteine (albumina)	6 luni	1 lună	1 lună	Exerciții fizice, convulsii, stres emotional sever, expunerea la temperaturi foarte scăzute, premenstrual, sarcină, imediat postpartum: ↑.	Hemoglobina (hematuria), infecții, secreții vaginale, menstra, mucus, ejaculare; pH alcalin, urină foarte concentrată, contaminare cu antiseptice (clorhexidina): fals ↑; Adsorbția pe pereții recipientelor de colectare; urina foarte diluată: fals ↓; medicamente: fals ↑ (fenazopiridine) sau ↓.
Nitriți	–	8 ore	4 ore	Antibioticele inhibă formarea nitriților, densitate crescută: ↓	Culoarea intensă a urinei ↑ (bilirubina, metaboliți ai coloranților azo): ↑; Acid ascorbic ↓.
Glucoza	2 zile	Peste 2 ore	2 ore	Sarcina, testare după o masă bogată, vârstă, febră, stres, infarct miocardic, testare după administrarea de glucoza; densitate urinară crescută (↓), scăzută (↑).	Păstrarea la temperatura camerei timp îndelungat: ↓ (glicoliză), bacteriile, acidul ascorbic, corpii cetonici (în cantitate mare): ↓; peroxidul, agenții oxidanți puternici: ↑.
Corpi cetonici	–	6ore	2ore	Inaniție, febră: ↑.	Urina păstrată timp îndelungat: ↓ (volatilizare). Fenilcetonele, ftaleinele, compuşii sulfhidrilici, levodopa, fenotiazine, eter, metformin, penicilamina, fenazopiridina, captopril: ↑.
Eritrocite	–	1-4 ore	1-4 ore	Menstruație, exerciții fizice intense, mari fumători, infecții prostatice: ↑; liza rapidă la densitate sub 1.010 și pH >7.	Medicamente (rifampicina, bromuri, ioduri, agenți oxidanți), hipocloriți folosiți pentru dezinfectarea recipientelor: ↑; bacteriurie (tulpini secretoare de catalaza cu acțiune similară peroxidazei Hb): ↑; alimente (sfeclă, mure, rubarbă), pigmenți (porfirie): ↑; doze mari de acid ascorbic: ↓.

Bilirubina	-	-	2 ore	-	Expunerea la lumină, acidul ascorbic, nitratul ↓; fenazopiridina ↑.
Urobilinogenul	-	-	2 ore	antibioticoterapia inhibă flora intestinală: ↓; variații diurne (vârf la ora 4.00 p.m.).	Expunerea la lumină: ↓; culoarea intensă a urinei ↑; fenazopiridina ↑; pH intens alcalin: ↑, pH intens acid: ↓

4. ANALIZA SÂNGELUI

Recoltarea, conservarea și centrifugarea sângelui

Tipuri de probe de sânge:

Sânge integral – sânge venos, arterial sau capilar a cărui compoziție și proprietăți ale componentilor celulari și extracelulari *in vitro* nu sunt afectate comparativ cu starea *in vivo*; prin adăugarea unor anticoagulanți, componentii sanguini se pot stabiliza pentru o anumită perioadă de timp;

Ser – supernatantul obținut prin centrifugarea sângelui (*recoltat fără anticoagulant*) după ce coagularea este completă; sângele se lasă la coagulat timp de 30 de minute (temperatura camerei), se desprinde coagulul aderent la pereții vasului și se centrifughează 10 minute la 3000 rot/min; supernatantul obținut este serul.

Plasma – supernatantul fără elementele figurate obținut în urma centrifugării sângelui *recoltat pe anticoagulant* (citrat de sodiu, heparină, EDTA, oxalat de potasiu); după recoltarea sângelui, sângele eprubeta se inversează de 2-3 ori pentru a se asigura omogenizarea anticoagulantului, se centrifugează la 3000 rot/min timp de 15 minute pentru a sedimenta elementele figurate; supernatantul rezultat este plasma; conținutul mai mare în fibrinogen și alți factori de coagulare, precum și de proteine în plasma comparativ cu serul, fac ca aceasta să aibă o vâscozitate mai ridicată.

Atât în cazul plasmăi cât și al serului, temperatura de lucru trebuie să fie în intervalul 15°C – 24°C.

Sângele integral se prelucrează imediat, iar serul și plasma pot fi depozitate. Prin congelare (-20°C sau -80°C) perioada de depozitare poate fi prelungită.

Avantaje plasmă vs. ser.

- implică o procesare mai rapidă deoarece se procesează imediat după colectarea probei
- randamentul de obținere mai mare: mai multă plasmă cu 15-20% izolată față de ser din același volum sanguin inițial
- prin folosirea anticoagulanților, se previn interferențele induse de coagulare (ex: coagularea poate bloca alimentarea supernatantului din ser în echipamentul de analiză)
- coagularea poate induce modificarea concentrațiilor unor analiți extra-celulari dincolo de limita de sensibilitate a echipamentului de analiză, manifestată prin:

- creșterea concentrației componentelor trombocitari în ser (potasiu, fosfat, magneziu, aspartat aminotransferază, lactat dehidrogenază, serotonină, zinc)
- creșterea concentrației unor constituenți ca rezultat al metabolismului celular și procesului de coagulare (glucoză, proteine totale, trombocite)
- activarea lizei celulare (leucocite, eritrocite, receptori)
- anumiți componenți nu pot fi analizați decât din plasma (serotonină, amoniac) pentru a obține rezultate relevante din punct de vedere clinic.

Dezavantajele plasmă vs. ser

- serul are o concentrație mai ridicată în K^+ , peptide care activează coagularea, trombocite (Ladenson și colab., 1974).
- anticoagulanții folosiți pot să interfere în anumite analize sau să schimbe concentrația unor analiți:
 - contaminarea cu NH_4^+ , Li^+ , Na^+ , K^+ .
 - interferența dată de reacția ionilor metalici din sânge și EDTA sau citrat (inhibarea fosfatazei alcaline în urma legării zincului cu EDTA, inhibarea metalo-proteinelor ca urmare a complexării calciului cu heparină)
 - interferența fibrinogenului în imunotestele eterogene
 - inhibiția sau catalizarea reacțiilor de către heparină (în lanțul de reacție al polimerazei)
 - interferența EDTA și citratului în distribuția ionilor între spațiul intracelular și extracelular (Cl^- , NH_4^+)
- electroforeza serului poate fi realizată doar după pre-tratamentul de coagulare
- anumite teste legate de bolile infecțioase pot fi efectuate doar pe ser (teste de aglutinare bacteriana).

Reacții de identificare a componentelor din sânge

Principiul metodelor

Metodele au la bază reacțiile dintre componentii sângelui și reactivi selectivi cu formarea unor compuși de culoare.

Identificarea formaldehidei în sânge

Principiul metodei

Metoda are la bază reacția dintre formaldehida prezentă în sânge cu acid cromotropic în mediul acid, cu formarea unei colorații violet (MacFadyen, 1945).

Reactivi și echipamente

- Sânge
- Acid cromotropic
- H_2SO_4
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

2 mL distilat alcoolic din sânge se tratează cu câteva cristale de acid cromotropic și se omogenizează. Se introduce un volum de 2 mL soluție de H_2SO_4 concentrat prin prelingere pe pereții eprubetei. În prezența formaldehidei, în zona contactului apare un inel violet care la agitare difuzează în întreaga masă a lichidului.

Identificarea alcoolului metilic în sânge

Principiul metodei

Metoda are la bază oxidarea alcoolului metilic în mediu acid la formaldehidă și reacția formaldehidei cu tiosulfat de sodiu.

Reactivi și echipamente

- Sânge
- $KMnO_4$
- H_3PO_4
- $Na_2S_2O_3$ solid
- H_2SO_4
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru:

2 mL distilat alcoolic din sânge se pune în contact cu o picătură de KMnO_4 în mediu de H_3PO_4 . După 5 minute se distruge excesul de KMnO_4 cu sulfat de sodiu sau bisulfat de sodiu adăugat în faza solidă, cristal cu cristal și se preling pe pereții eprubetei un volum de 2 mL de H_2SO_4 concentrat. În prezența alcoolului metilic, la zona de separare se observă apariția unui inel violet care difuzează în întreaga masă a lichidului.

Identificarea hormonilor tiroidieni**Principiul metodei**

Reacția are la bază reacția de nitrare a grupării fenol din molecula de tirozină cu formarea unui precipitat de culoare roșie (Sapkota, 2022).

Reactivi și echipamente

- Soluție apoasă de tirozină (produs farmaceutic)
- Reactiv Millon: 1,5 ml Hg metalic se dizolvă în 30 ml HNO_3 concentrat, iar după răcire se aduce la volum de 100 mL
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

Se amestecă 1 ml soluție tirozină cu 1 ml reactiv Millon și se încălzește ușor. Se observă apariția unei colorații roz sau chiar a unui precipitat de culoare roșie.

Identificarea insulinei prin metoda biuretului – Metoda Piotrowski**Principiul metodei**

Insulina reacționează în mediu bazic cu CuSO_4 formând un complex denumit “biuret” de culoare violet. Intensitatea culorii este proporțională cu concentrația insulinei.

Reactivi și echipamente

- Soluție apoasă de insulină
- Soluție de CuSO_4 1%
- Soluție de NaOH 10%
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

1 ml soluție de insulină se alcalinizează cu câteva picături de NaOH și se adaugă câteva picături de CuSO_4 1%. În prezența insulinei apare o colorație violet.

Reacții de dozare a componentilor din sânge (BIOCHIMIE)

Izolarea și dozarea alcoolului în sânge

Principiul metodei

Alcoolemia se exprimă prin cantitatea de alcool care se găsește în 1000 mL sânge (g alcool/1000 mL).

Pentru determinarea alcoolemiei în sânge se parcurg două etape: (i) izolarea alcoolului din sânge prin distilare și (ii) dozarea alcoolului în distilatul rezultat (Banciu și Oarda, 1964; Cotroiu și Proca, 1988; Roman și Morait, 1983).

Izolarea alcoolului din sânge

Principiul metodei

Alcoolul din sânge este separat prin distilare și captat într-o soluție de acid succinic.

Reactivi și echipamente

- Sânge venos colectat *à jeun* (pe nemâncate) sau postprandial fără anticoagulant cu/fără gel separator care se va păstra închis pentru a nu se evaporă alcoolul;

- Piatra ponce
- Acid succinic 2,5%,
- Instalație de distilare cu refrigerant ascendent
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

5 mL de sânge se omogenizează cu 45 mL acid succinic și se fierbe (în prezență de bucățele de piatră ponce pentru uniformizarea fierberii). Se culeg 25 mL distilat în care se pun inițial 2-3 picături de apă distilată. În cazul unui volum de probă mai mic de 5 mL se ia în lucru tot volumul de probă și se aduce la volum de 50 mL cu soluție de acid succinic 2,5%. Se efectuează distilarea până

la recoltarea unui volum de distilat de 5 ori mai mare decât cantitatea de material luată în lucru (3 mL proba + 47 mL soluție de acid succinic, 15 mL distilat).

Dozarea alcoolului din sânge

Metoda sulfocromică Nicloux (Mishkind, 1952)

Principiul metodei

Metoda sulfocromică are la baza oxidarea în mediu acid sulfuric a alcoolului cu bicromat de potasiu, proces în urma căruia Cr^{6+} se oxidează la Cr^{3+} iar culoarea soluției se schimbă de la verde-albastru la verde-gălbui:



Reactivi și echipamente

- Distilat din ser sanguin obținut conform metodei anterioare
- Soluție apoasă de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 19%: se cântăresc exact la balanța analitică [19 g $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ pulverizat și uscat în prealabil la 120°C – 150°C timp de 3-4 ore până la masă constantă, se aduce la semn la 1000 mL; soluția de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ se verifică cu o soluție etalon (1 mL alcool etilic absolut la 1000 mL soluție)
- H_2SO_4 98% lipsit de substanțe reducătoare
- Acid cromotropic solid
- KMnO_4
- H_3PO_4
- Instalație de titrare
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

2 mL distilat (corespunzând la 0,4 mL sânge) se introduce într-o eprubetă și se adaugă picătură cu picătură soluție de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ 19% sub agitare ușoară până la apariția culorii galben-verde persistentă.

Calculul rezultatelor

$$\text{Concentrația de alcool, mL alcool/1000 mL sânge} = 12,5 \times nN \quad (4.1)$$

în care:

12,5 – factor de corecție, reprezentând 0,0125 mL alcool oxidați de 1 mL soluție K₂Cr₂O₇ 19%

N – volumul soluției de K₂Cr₂O₇ 19% folosit la titrare, mL

Valoarea alcoolemiei sângelui se calculează conform relației:

$$\text{Alcoolemie (g alcool/L mL sânge)} = \text{Concentrație alcool (mL alcool/1 L sânge)} \times 0,8 \quad (4.2.)$$

Observații

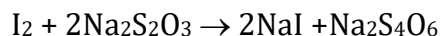
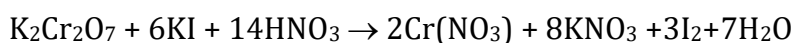
La concentrații peste 3% alcool se reia dozajul pe 1 mL distilat (la concentrații mari de alcool acuratețea metodei scade) iar în calculul rezultatelor se va ține cont de volumul de distilat luat în lucru.

Dacă concentrația de alcool corespunde unei stări comatoase sau mortale se verifică să nu existe erori induse de sterilizarea instrumentarului cu alcool sau de la dezinfectarea pielii.

Metoda nitrocromatică Cordebard

Principiul metodei

Metoda are la bază oxidarea alcoolului etilic izolat din sânge cu amestec nitrocromic până la acid acetic urmată de titrarea iodometrică a excesului de bicromat de potasiu:



Reactivi și echipamente

- Distilat de ser sanguin
- Soluție HNO₃ cu densitatea 1,4-1,42 g/cm³ lipsit de substanțe reducătoare
- Soluție KI 2% proaspăt preparată
- Soluție K₂Cr₂O₇ N/6,9 (0,144 N): o cantitate exactă de 7.1065 g K₂Cr₂O₇, pulverizat și uscat la 120°C – 150°C timp de 3-4 ore până la masă constantă, se aduce la semn la 1000 mL; se păstrează în sticle cu dop rodat, la întuneric; 1 mL soluție K₂Cr₂O₇ N/6,9 (0,144 N) conține 0,0071 g K₂Cr₂O₇; 3 mL soluție K₂Cr₂O₇ N/6,9 (0,144 N) corespund la 10 mL soluție Na₂S₂O₃ N/23 (0,0435); 1 mL soluție K₂Cr₂O₇ N/6,9 (0,144 N) oxidează 5 mg alcool etilic

- Soluție apoasă de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ N/23: 11,3 g $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ și se dizolvă în 200 mL apă distilată proaspăt fiartă și răcită, se adaugă 0,10 g NaCO_3 anhidru și se aduce la semn la 1000 mL. Pentru stabilizare, soluția se lasă cel puțin 5-8 zile la întuneric și i se stabilește factorul. Soluția de factor 1 se verifică prin titrare cel puțin o dată pe săptămână

- Acid cromotropic solid
- KMnO_4
- H_3PO_4
- H_2SO_4
- Instalație de titrare

Mod de lucru

A. Stabilirea factorului de corecție al soluției de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$

Se introduc 5 mL apă distilată într-un vas cu dop rotat, se adaugă 3 mL soluție de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ N/6,9 (0,144 N), 4 mL HNO_3 și 20 mL soluție KI 2%. După 3 minute, timp în care vasul se păstrează cu dopul pus, se titrează cu soluția de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ al cărui factor trebuie determinat.

Factorul soluției se calculează cu relația:

$$F = 10/N \quad (4.3)$$

în care:

10 – volumul (mL) de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ care corespunde la volumul de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ N/6,9 (0,144N) folosit

N – volumul soluției de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ consumat la titrare, mL

B. Dozarea cantității de alcool din sânge

5 mL de distilat se introduce într-un flacon cu dop rotat, se adaugă 3 mL soluție $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ N/6,9 (0,144 N) și 4 mL HNO_3 . Se astupă flaconul și se lasă 15 minute în repaos pentru oxidarea alcoolului (nu se prelungeste timpul de oxidare pentru a nu începe oxidarea cetonelor, eterului și altor compuși volatili) și se adaugă 20 mL soluție KI 2% iar după 3 minute se titrează iodul eliberat cu soluția de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ N/23.

Calculul rezultatelor

Cantitatea de alcool din distilat se calculează conform relației:

$$\text{Concentrație alcool, g/1 L mL sânge} = \frac{10 - n * F}{2} \quad (4.4)$$

în care:

10 – volumul soluției de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ căruia îi corespund 3 mL soluție $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ N/6,9 (0,144 N), care oxidează 5 mg alcool etilic, mL

n – volumul soluției de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ N/23 folosiți la titrare, mL

F – factorul soluției de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ N/23, adimensional

Observații:

Pentru excluderea erorilor cauzate de formaldehidă sau alcool etilic care pot exista în distilat se verifică existența celor doi produși, astfel:

Formaldehida: se dau câteva cristale de acid cromotropic în 2 mL distilat și se omogenizează ușor. Un volum de 2 mL soluție de H_2SO_4 concentrat se prelinge pe pereții eprubetei. În prezența formaldehidei, la zona de contact dintre soluții apare un inel violet care la agitare difuzează în întreaga masă a lichidului.

Alcoolul metilic: 2 mL distilat se amestecă cu 1-2 picături de H_3PO_4 și o picătură de KMnO_4 . După 5 minute se distruge excesul de KMnO_4 cu sulfid de sodiu sau bisulfid de sodiu adăugat în faza solidă, cristal cu cristal și se preling pe pereții eprubetei 2 mL de H_2SO_4 concentrat. În prezența alcoolului metilic, la zona de contact se observă apariția unui inel de culoare violet care difuzează în întreaga masă a lichidului.

Dozarea colesterolului din sânge

Aspecte generale

Colesterolul este un compus lipidic (steroid) care face parte din structura membranelor celulare din țesuturile animale (creier, ficat, măduva spinării) și vegetale (uleiuri). Majoritar, colesterolul este sintetizat de către organism (în special în ficat) și doar o mică parte provine din dietă. Colesterolul intervine în variate procese metabolice, face parte din structura bilei, a vitaminei D și a mai multor hormoni (testosteron, estrogeni). Având o structură apolară este insolubil în apă, circulând în organism legate de lipoproteine (complexe proteine-lipide). În raport cu densitatea lor, acestea se clasifică în: chilomicroni, VLDL (very low density lipoprotein), LDL (low density lipoprotein), IDL (intermediate density lipoprotein), HDL (high density lipoprotein). HDL-ul transportă colesterolul de la țesuturi la ficat. Datorită faptului că împiedică formarea plăcii de aterom HDL a fost denumit "colesterolul bun". În opoziție, LDL-ul transportă colesterolul de la ficat la celulele organismului favorizând formarea plăcii de aterom, fiind denumit "colesterolul rău".

Apariția aterosclerozei (depunerea plăcii de aterom pe pereții vaselor de sânge) este favorizată de o serie de factori de risc grupați astfel: (i) factori de risc care nu pot fi modificați

(istoricul familial; bărbați cu vârsta > 45 ani, femei cu vârsta > 55 ani); (ii) factori de risc care pot fi modificați (stilul de viață: obezitate, sedentarism, fumatul, dieta bogată în grăsimi animale), hipertensiunea arterială; HDL colesterol scăzut; LDL colesterol crescut, diabetul (Laborator Synevo (a), 2010; Popa Cristea, 1998; Betteridge, 1989).

Dozarea colesterolului total - Metoda cu acid sulfosalicilic

Principiul lucrării

Metoda are la bază eliberarea colesterolului din fracțiunea esterificată și a celui legat de lipoproteinele serice în prezența acidului sulfosalicilic în acid acetic glacial (Pintea și colab., 2008, Laborator Synevo (a), 2010).

Aparatură și echipamente

- Ser sanguin: se recoltează sânge venos à jeun în vacutainer fără anticoagulant cu/fără gel separator și se centrifughează pentru separarea serului. Se respinge specimenul intens hemolizat sau sânge recoltat interprandial.

- Anhidridă acetică
- H₂SO₄ concentrat
- Soluție de acid sulfosalicilic 12% în acid acetic glacial
- Soluție standard de colesterol (250 mg/100 mL acid acetic glacial)
- Ser fiziologic (NaCl 0,85%).
- Spectrometru UV-VIS
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

Se pregătesc probele conform Tabelului 4.1.

Tabelul 4.1. Soluțiile pentru dozarea colesterolului din sânge

Reactivi	Proba de analizat	Proba standard	Blank
Soluție de acid sulfosalicilic, mL	1,2	1,2	1,2
Ser sanguin, mL	0,2	-	-
Soluție etalon de colesterol, mL	-	0,2	-
Ser fiziologic, mL	-	-	0,2
Anhidridă acetică, mL	3,0	3,0	3,0
Se agită cu atenție și se lasă eprubetele la răcit la temperatura camerei			

H ₂ SO ₄ concentrat, mL	0,4	0,4	0,4
Omogenizare, păstrare la întuneric 10 minute			
Absorbanța la 610 nm	Ap	As	-

Calculul rezultatelor

Cantitatea de colesterol total se calculează cu relația:

$$\text{Colesterol total, mg/100 mL} = A_p \times 250 / A_s \quad (4.5)$$

Dozarea colesterolului total și liber - Metoda cu digitonină

Principiul metodei

Colesterolul total se dozează în urma evaluării intensității culorii complexului obținut în urma reacției acestuia cu soluție de FeCl₃ în mediu de H₂SO₄. Colesterolul liber se dozează după extragerea cu digitonină și evaluarea intensității culorii complexului colorat (Albu, 2001).

Reactivi și echipamente

- Ser: se recoltează sânge venos *à jeun* în vacutainer fără anticoagulant cu/fără gel separator și se separă serul prin centrifugare. Serul separat se lucrează în aceeași zi sau se stochează la 4°C ori la -20°C. Se respinge specimenul intens hemolizat sau sânge recoltat interprandial

- Acid acetic glacial
- Soluție de FeCl₃: 2,5g FeCl₃·6H₂O se dizolvă în 100 mL H₃PO₄ 85%
- Reactivul de culoare: 4 mL soluție de clorură ferică se dizolvă în 50 mL H₂SO₄ concentrat
- Soluție de digitonină 1%: 1 g digitonină se dizolvă în 50 mL etanol 95% și se aduce la volum de 100 mL cu apă distilată. Este stabil aproximativ 6 luni dacă se păstrează la întuneric
- Standard de colesterol (0,2%): se dizolvă 2000 mg colesterol pur în 100 mL acid acetic glacial și se diluează de 10 ori (1:9) cu acid acetic glacial
- Acetonă-95% etanol 1:1 (v:v)
- Spectrometru UV-VIS
- Sticlărie de laborator

Observații:

1. Urmele de apă influențează reacția, de aceea vasele de laborator trebuie să fie perfect curate și uscate.
2. Acidul acetic nu trebuie să conțină acid glioxilic. În cazul prezenței acestuia, se recomandă îndepărtarea acestuia prin distilare în prezența anhidridei cromice.

Mod de lucru

A. Determinarea colesterolului total: se pregătesc probele conform Tabelului 4.2.

Tabelul 4.2. Prepararea soluțiilor pentru dozarea colesterolului total

Reactivi	Blank	Proba de analizat	Proba standard
Acid acetic glacial, mL	6	6	6
Apă distilată, mL	0,1	-	-
Soluție standard colesterol, mL	-	-	0,1
Ser, mL	-	0,1	
Omogenizare			
Reactiv de culoare (FeCl ₃ în H ₂ S ₄), mL	4	4	4
Omogenizare			
Citire absorbantă la 550 nm	-	Ap	As

B. Determinarea colesterolului liber: se pregătesc probele conform Tabelului 4.3.

Tabelul 4.3. Compoziția soluțiilor pentru dozarea colesterolului liber

Reactivi	Proba de analizat	Proba standard	Blank
Ser, mL	0,1	-	-
Standard de colesterol, mL	-	0,1	-
Apă distilată, mL	-	-	0,1
Acetonă-95% etanol	1	-	-
Soluție digitonină, mL	1	1	1
Omogenizare, 10 minute repaos, Centrifugare 5 minute la 3000 rpm, Aruncare supernatant, Uscare precipitat 5 minute în curent de N ₂			
Precipitat uscat	+	+	-
Solubilizare precipitat cu acid acetic glacial, mL	6	6	6
Omogenizare			
Reactiv de culoare (FeCl ₃ în H ₂ S ₄), mL	4	4	-
Omogenizare, 10 minute repaos			
Absorbanta la 550 nm	Ap	As	-

Calculul rezultatelor

$$\text{Colesterol total (mg colesterol total/100 mL ser)} = \frac{A_p}{A_s} \times \text{Concentratie standard} \quad (4.6.)$$

$$\text{Colesterol liber (mg colesterol liber/100 mL ser)} = \frac{A_p}{A_s} \times \text{Concentratie standard} \quad (4.7)$$

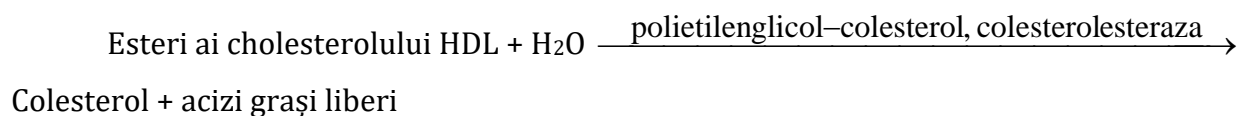
$$\text{Colesterol legat (mg colesterol legat/100 mL)} = \text{Colesterol total (mg/100 mL)} - \text{Colesterol liber (mg/100 mL)} \quad (4.8)$$

Determinare colesterolului liber și esterificat din serul sanguin cu spectrofotometrul BioSystems BTS-350 - Metoda enzimatică

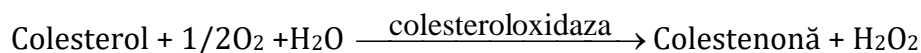
Principiul metodei

Metoda are la bază dozarea enzimatică a colesterolului din serul sanguin în prezența colesterol-esterazei, colesterol-oxidazei cuplate cu polietilenglicol-colesterol (PEG-colesterol) și peroxidazei cu formarea unui complex roșu a cărui intensitate este proporțională cu cantitatea de colesterol HDL (cf. Prospect - Cholesterol, BioSystems, 2022 cf.). Sunt parcurse următoarele etape:

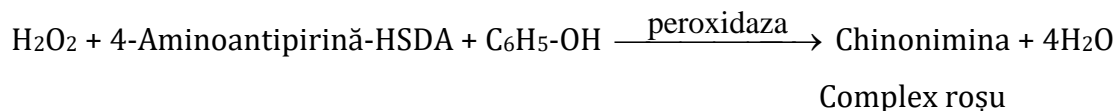
(1) Esterii de colesterol sunt clivați sub acțiunea colesterol-esterază cu formare de colesterol și acizi grași:



(2). Colesterolul format este convertit la colesterol-4-en-3-onă (colestenonă) și peroxid de hidrogen sub acțiunea colesterol-oxidazei:



(3) Peroxidul de hidrogen format reacționează cu 4-aminoantipirina și fenolul și formează în prezența peroxidazei un complex colorat în roșu (roșu chinoa, chinonimina):



(4) Intensitatea complexului colorat se măsoară spectrofotometric.

Aparatură și reactivi

- Ser proaspăt: recoltare sânge venos *à jeun* în vacutainer fără anticoagulant sau plasmă pe heparină sau EDTA. Nu se folosesc anticoagulanți pe bază de citrat. Probele nu se congelează. Se respinge specimenul intens hemolizat. Sângele este lăsat 30 minute pentru coagulare și sedimentare și apoi se centrifughează la 1500 x g pentru 30 minute la 4°C (dacă se folosește o centrifugă fără refrigerare probele se imersează imediat într-o baie cu gheață și se mențin acolo până la prelucrare)

- Reactiv de precipitare (A): soluție buffer 35 mmol/L; colat de sodiu > 0,5 mmol/L; fenol 28 mmol/L; colesterol esteraza > 0,2 U/mL, colesterol oxidaza > 0,1 U/mL; peroxidaza > 0,8 U/mL; 4-aminoantipirină 0,5 mmol/L, pH = 7

- Soluție standard de colesterol (S): colesterol 200 mg/dL (5,18 mmol/L)

- Ser de control biochimic de nivel I (normal)

- Ser de control biochimic de nivel II (patologic)
- Spectrofotometru BioSystems BTS-350
- Baie de apă
- Baie de gheață
- Apă deionizată
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru (cf. Prospect - Cholesterol, BioSystems 2022)

A. Pregătirea probelor: se pregătesc soluțiile conform Tabelului 4.4. (Figura 4.1.).

Tabelul 4.4. Compoziția soluțiilor pentru dozarea colesterolului liber și esterificat

Reactiv	Blank	Standard	Ser control biochimic I	Ser control biochimic II	Probă
Standard colesterol (S)	-	10 μ L			-
Ser de control biochimic de nivel I (normal)	-	-	10 μ L	-	-
Ser de control biochimic de nivel II (patologic)	-	-	-	10 μ L	-
Proba de analizat	-	-	-	-	10 μ L
Reactiv de precipitare	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL	10 mL
Se omogenizează eprubetele și se incubează timp de 10 minute la temperatura camerei (16-25°C) sau pentru 5 minute la 37°C (cronometrare timp de incubare).					
Se citește absorbanta probelor la 500 nm	-	A _S	A _{SI}	A _{SII}	A _P

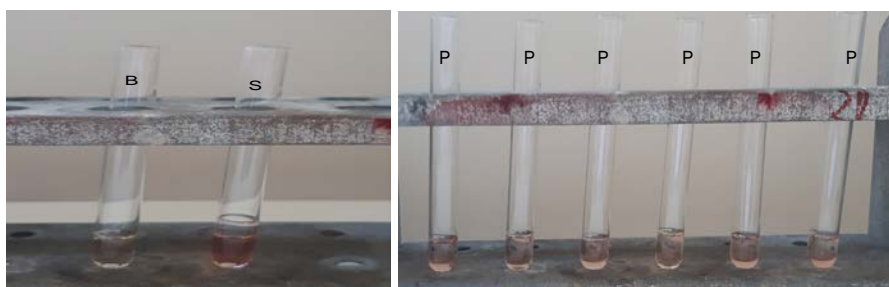


Figura 4.1. Dozarea colesterolului total folosind metoda enzimatică

B – blank, S – standard, P – probe

B. Utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350:

B.1. Introducerea/Verificarea metodei de analiză -introduce/ verifică parametrii specifici analizării analitului: concentrațiile standardelor, blank, controlul, liniaritatea metodei, numărul de replici, unitatea de măsură, lungimea de undă folosită la citire, etc.

B.2. Măsurarea concentrației analitului investigat în probe – citește absorbanțele probelor și standardului în raport cu blank-ul și afișează rezultatul.

În Anexa 3.1. se exemplifică utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350 la analiza acidului uric urinar. Pentru dozarea colesterolului, se parcurg aceiași pași, alegând din meniurile *Programare* și *Concentrații* metoda pentru Colesterol.

Calculul rezultatelor

Concentrația colesterolului din proba de analizat afișată pe ecran este calculată cu relația:

$$C_{\text{colesterol}} = \frac{\text{Absorbantă probă}}{\text{Absorbantă standard}} * C_{\text{standard}} \quad (4.9)$$

Valori de referință pentru colesterol

Acceptabil	Până la 200 mg/dL = 5,2 mmol/L
La limita de risc	200 - 239 mg/dl = 5,2 - 6,21 mmol/L
Crescut (valori patologice)	> 240 mg/dL = 6,24 mmol
Valori de alertă	> 400 mg/dL

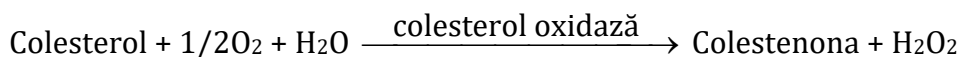
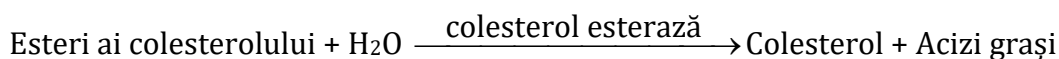
Observații

- reactivii trebuie aduși la temperatura camerei înainte de folosire
- colesterolul în ser sau plasmă este stabil 7 zile la 2-8°C
- pot fi folosiți ca agenți de anticoagulare heparina, EDTA, oxalat și florură

Determinare HDL în serul sanguin cu spectrofotometrul BioSystems BTS-350

Principiul metodei

Metoda separă lipoproteinele cu densitate mare (HDL) de lipoproteinele cu densitate foarte scăzută (VLDL) și a cele cu densitate scăzută (LDL) precipitând ultimele două clase cu fosfotungstat și ioni de magneziu. Colesterolul HDL din supernatant se dozează spectrofotometric conform succesiunii de reacții:



Aparatură și reactivi

- Ser sau plasmă recoltate prin proceduri standard; Heparina, EDTA, oxalat și florură pot fi folosiți drept anticoagulanți

- Reactiv A: Fosfotungstat 0,4 mmol/L, clorura de magneziu 20 mmol/L

- Reactiv B: PIPES 70 mmol/L, colesterol esterază > 0,2 U/mL, colesterol oxidaza > 0,1 U/mL, peroxidază > 1 U/mL, 4-aminoantipirina 0,5 mmol/L, cholat de sodiu 0,5 mmol/L. Diclorfenilsulfonat 4 mmol/L, pH 7,0

- Soluție standard de HDL colesterol (S): colesterol 15 mg/dL . Standard lichid primar

- Spectrofotometru BioSystems BTS-350

- Centrifugă

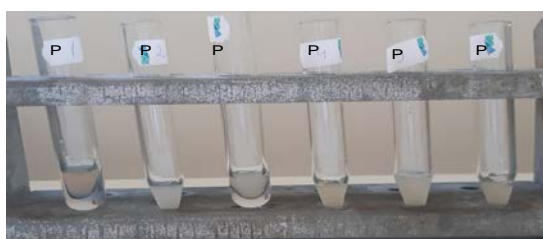
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru (cf. Prospect – HDL Cholesterol, BioSystems 2022)

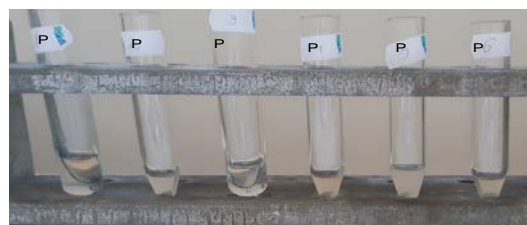
A. Precipitarea VLDL și LDL: se pregătesc eprubetele de centrifugare conform Tabelului 4.5. (Figura 4.2).

Tabel 4.5. Separarea fracțiunii HDL de fracțiunile VLDL și LDL

Proba	0,2 mL
Reactiv A	0,2 mL
Se omogenizează puternic și se lasă eprubete 10 minute la temperatura camerei	
Se centrifughează 10 minute la minim 4000 rpm	
Se colectează supernatantul; se adaugă 0,5 mL reactiv A dacă prezintă turbiditate sau flocoane, se omogenizează intens și se centrifughează. Concentrația obținută se multiplică cu factorul de diluție 1,7	



Probe înainte de centrifugare



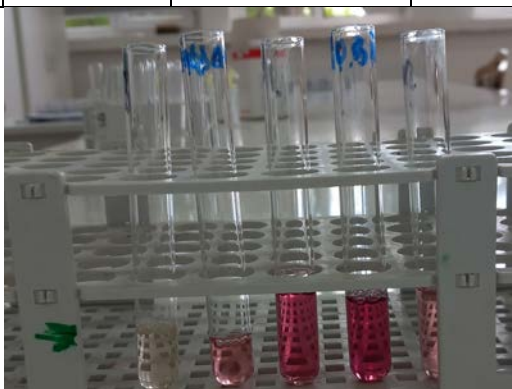
Probe după centrifugare

Figura 4.2. Separarea fracțiunii HDL de VLDL și LDL

B. Pregătirea probelor pentru dozarea colesterol HDL: se pregătesc soluțiile conform Tabelului 4.6 (Figura 4.3).

Tabelul 4.6. Compoziția soluțiilor pentru dozarea HDL colesterol

Reactiv	Blank	Standard	Ser control biochimic I	Ser control biochimic II	Supernatant probă
Apa distilată	50 μ L	-	-	-	-
Standard HDL colesterol (S)	-	50 μ L	-	-	-
Supernatant probă	-	-	-	-	50 μ L
Ser de control biochimic de nivel I (normal)	-	-	50 μ L	-	-
Ser de control biochimic de nivel II (patologic)	-	-	-	50 μ L	-
Reactiv (B)	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Se omogenizează eprubetele, se incubează timp de 30 minute la 16-25°C sau 10 minute la 37°C					
Se citește absorbanta probelor la 500 nm	-	A _S	A _{S1}	A _{SII}	A _P

**Figura 4.3.** Dozarea HDL

B – blank, S – standard, P - probă

B. Utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350:

B.1. Introducerea/Verificarea metodei de analiză -introduce/ verifică parametrii specifici analizării analitului: concentrațiile standardelor, blank, controlul, liniaritatea metodei, numărul de replici, unitatea de măsură, lungimea de undă folosită la citire, etc.

B.2. Măsurarea concentrației analitului investigat în probe – citește absorbanțele probelor și standardului în raport cu blank-ul și afișează rezultatul.

În Anexa 3.1. se exemplifică utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350 la analiza acidului uric urinar. Pentru dozarea HDL colesterol, se parcurg aceiași pași, alegând din meniurile *Programare* și *Concentrații* metoda pentru HDL Colesterol.

Calculul rezultatelor

Concentrația HDL colesterol în proba de analizat afișată pe ecran este calculată cu relația:

$$C_{\text{HDL Colesterol}} \text{ (mg/dL)} = \frac{A_P}{A_S} * \text{Conc_standard} * \text{Fdiluție} \quad (4.10)$$

unde:

Conc_standard – concentrația standardului, mg/mL

Fdiluție – factorul de diluție

Dacă se folosește standardul HDL colesterol, rezultatele vor fi:

	Ser sau plasmă
$\frac{\text{Abs_probă}}{\text{Abs_standard}}$	X 52,5 = mg/dL HDL colesterol X 1,36 mmol HDL colesterol

Valori de referință orientative pentru HDL colesterol

Risc crescut	Până la 35 mg/dL = 0,91 mmol/L
Risc scăzut	> 60 md/dL = 1,56 mmol/L

Observații

- Concentrații scăzute ale colesterol HDL sunt asociate cu: afecțiuni hepatice acute sau cronice, hiperalimentație intravenoasă, malnutriție severă, diabet, anemie cronică, afecțiuni mieloproliferative, fumatul, etc.

- Rezultatele de la laborator trebuie integrate datelor clinice.

Dozarea glucozei din sânge (glicemia)

Aspecte generale

Glucoza este considerată cel mai important monozaharid din sânge, provenind din metabolizarea carbohidraților și conversia la nivelul ficatului a glicogenului. Aceasta furnizează energie activității celulare, nivelul acesteia în sânge fiind reglat în principal de activitatea opusă a doi hormoni: (i) glucagonul care mărește viteza de conversie a glicogenului în glucoză și favorizează creșterea glicemiei; (ii) insulina care crește permeabilitatea membranelor celulare la glucoză și stimulează formarea glicogenului scăzând astfel glicemia. Metabolizarea glucozei poate fi alterată de mai mulți factori: incapacitatea celulelor pancreatice beta de a produce insulina, scăderea numărului receptorilor de insulină, malabsorbția intestinală a glucozei, capacitatea redusă a ficatului de a metaboliza glicogenul, modificarea concentrației hormonilor implicați în metabolismul glucozei. Excesul de glucoză în sânge se numește diabet zaharat și se asociază cu

risc de afectare a microcirculației (retinopatie, nefropatie și neuropatie), complicații microvasculare și macrovasculare specifice (boli cardiovasculare) și o speranță de viață scăzută. Stabilirea diagnosticului de diabet are la bază determinarea concentrației plasmatică a glucozei (Fischbach (a), 2009; Laborator Synevo (d), 2010; Laboratory Corporation of America (a), 2010; Lothar, 1998). Alături de glucoză în sânge există și alte substanțe cu caracter reducător (acid ascorbic, glutation, acid uric, cisteină). Plecând de la acest aspect, metodele chimice de cuantificare a valorile glicemiei obținute bazate pe proprietățile reducătoare ale glucozei (metoda Hagedorn-Jensen) sunt în număr mai mare decât cele obținute prin metoda enzimatică specifică cu glucozoxidază (Albu, 2001).

Interval de referință:

- 65 -110 mg/dL sânge integral, ser sau plasmă

Variații fiziologice și patologice

- hiperglicemii fiziologice: frig, emoții, efort fizic
- hiperglicemii patologice: diabet zaharata
- hipoglicemii fiziologice: inaniție
- hipoglicemii patologice: insulinoame (tumori ale pancreasului), supradozaj de insulină

Valori ale glicemiei pentru diagnosticul de diabet zaharat:

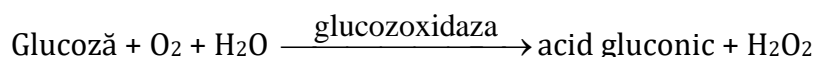
- glicemia în orice moment al zilei > 200 mg/dL
- glicemia à jeun > 126 mg/dL
- glicemia la 2 ore în timpul TTGO (testul de toleranță la glucoză) > 200 mg/dL

Dozarea glucozei din sânge - Metoda enzimatică

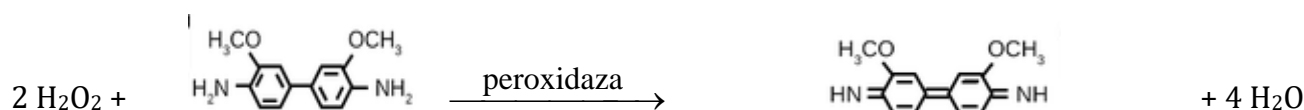
Principiul lucrării

Metoda are la bază următoarele etape:

(1) Oxidarea glucozei sub acțiunea glucozoxidazei până la acid gluconic și apă oxigenată.



(2) Apa oxigenată formată reacționează cu forma redusă a o-Dianisidină (incoloră) în prezența peroxidazei, cu formarea unui compus colorat în roșu (o-dianisidina forma oxidată)



Complex roșu

(3) Intensitatea culorii roșii a complexului, proporțională cu concentrația de glucoză, se citește la spectrofotometru la lungimea de undă 436 nm (Pintea și colab., 2008; Dronca și colab., 2014).

Aparatură și echipamente

- Ser nehemolizat, plasmă, sânge deproteinizat recoltat din sânge venos recoltat *à jeun* (fără aport caloric în ultimele 8 ore) în vacutainer fără anticoagulant cu/fără gel separator (de preferat vacutainer cu NaF/Na₂EDT -previne coagularea sângelui și inhibă glicoliza). La diabetici, recoltarea probelor de sânge se face înaintea administrării insulinei sau medicației hipoglicemizante.

- Ser nehemolizat recoltat din sânge venos recoltat la 2 ore postprandial

- Ser nehemolizat, plasmă din sânge venos recoltat într-un moment aleator al zilei (random), indiferent de timpul scurs de la ultima masa

- Ser nehemolizat, plasmă recoltate din sânge venos obținut în cadrul testului de toleranță la glucoză. După recoltare, sângele se prepară astfel:

a) scentrifugare pentru separarea serului (în < 2 ore de la recoltare. Centrifugarea se face doar după coagularea completă, pentru a nu evita prezența resturilor de fibrină; valoarea glicemiei scade cu vechimea probei în condițiile menținerii probei necentrifugate la temperatura camerei

b) o stabilitate de 24 ore a glucozei în sângele integral la temperatura camerei se obține prin recoltare pe combinație: inhibitor de glicoliză (NaF) + anticoagulant

- Reactivul de culoare: soluție fenol 100 mM

- Soluție de 4-aminoantipirină (4-AAP) 1 mM

- Soluție tampon fosfați pH = 7,0

- Glucozoxidază ≥ 15000 U/l

- Peroxidaza ≥ 500 U/l

- Soluție standard de glucoză 100 mg/100 mL (5,56 mmol)

- Spectrometru UV-VIS

- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

Se pregătesc soluțiile conform Tabelului 4.7.

Tabelul 4.7. Compoziția soluțiilor pentru dozarea glucozei serice

Reactiv	Blank	Proba standard	Proba de analizat
Reactivul de culoare, mL	1	1	1
Soluție standard de glucoză, μ L	-	10	-
Ser fiziologic, mL	-	-	10
Agitare, incubare 30 minute la 20 – 25°C sau 5 minute la 37°C			
Absorbanța la 436 nm	-	As	Ap

Calculul rezultatelor

Concentrația de glucoză din ser se calculează cu formula :

$$\text{Glucoză (mg/100 mL ser)} = \text{Ap} \times 100 / \text{As} \quad (4.11)$$

Testul de toleranță la glucoză (TTGO)

Testul de toleranță la glucoză pe cale orală (TTGO, Donna Medical Center, Dronca și colab., 2014) este un test provocat folosit pentru a evidenția eficiența organismului în metabolizarea glucozei și a pune în evidență diabetul zaharat. Nu se folosește TTGO pentru diagnosticul de rutină sau pentru monitorizarea zilnică a nivelului glicemiei. Efectuarea TTGO se recomandă în următoarele situații: (i) sarcină în săptămânile 24 - 28 de gestație, cu istoric familial de diabet sau antecedente de avort spontan, obezitate, episoade inexplicabile de hipoglicemie, nașteri premature, nașteri de feți morți, pacienți cu niveluri de graniță ale glicemiei bazale sau postprandiale, istoric familial de diabet zaharat.

Testul se va desfășura respectând anumite condiții:

- se aplică doar la pacienți ambulatori
- pacienții trebuie să fie sănătoși (minim 2 săptămâni după o boală infecțioasă sau intervenție chirurgicală) și să nu prezinte hipokaliemie sau hipermagneziemie
- cu 3 zile înaintea testului pacienții vor urma o dietă bogată în carbohidrați, cu minim 150 g carbohidrați/zi
- testul se efectuează dimineața à jeun (după 10-12 ore de post)
- în timpul testului nu se mănâncă, nu se bea cafea sau ceai, nu se fumează, fără efort fizic
- pacientul informează medicul despre medicamentele pe care le folosește și eventual, le întrerupe cu 3 zile înaintea testului, dacă acest lucru este posibil și avizat de medic

Testul este contraindicat în: infecții severe, boli endocrine, greață.

Reacții adverse care se pot apărea la efectuarea testului: amețeală, tremor, stare de nervozitate, transpirații, lipotimie.

Desfășurarea testului:

1. Pacientului adult i se administrează pe cale orală 75 g glucoză diluată în 100 mL apă rece
2. Pacienților copii li se administrează 1.75 g/kg corp de glucoză (maxim 75 g)
3. Se recoltează 2 probe de sânge: prima, imediat înainte de administrarea glucozei iar a doua după 2 ore și se dozează glucoza în probele de sânge. La cererea medicului se pot recolta probe de sânge suplimentare la 30, 60, 90, 180 minute
4. În cazul necesității stabilirii diabetului gestațional, testul se efectuează în săptămânile 24 – 28 de sarcină și presupune măsurarea glucozei în trei probe:
 - pe nemancate (concentrație normală a glucozei < 92 mg glucoză/dL)
 - la o oră (concentrație normală a glucozei < 180 mg glucoză/dL)
 - la două ore după consumul a 75 g glucoză (concentrație normală a glucozei < 153 mg glucoză/dL)

Aparatură și reactivi

- Seruri recoltate la 0 minute, 30 minute, 60 minute, 90 minute și 120 minute
- Reactivul de culoare: soluție fenol 100 mM
- Soluție de 4-aminoantipirină (4-AAP) 1 mM
- Soluție tampon fosfați pH = 7,0
- Glucozoxidază ≥ 15000 U/l
- Peroxidaza ≥ 500 U/l
- Soluție standard de glucoză 100 mg/100 mL (5,56 mM)
- Spectrometru UV-VIS
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

Se pregătesc eprubetele conform indicațiilor din Tabelul 4.8.

Tabelul 4.8. Pregătirea soluțiilor pentru testarea toleranței la glucoză

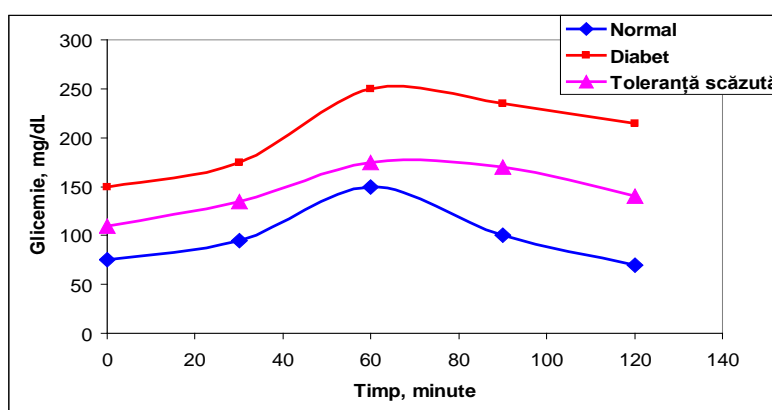
Reactiv	Probe					Standard	Martor
	0 minute	30 minute	60 minute	90 minute	120 minute		
Ser	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	-	-
Standard glucoză	-	-	-	-	-	0,2	-
Apă distilată	-	-	-	-	-	-	0,2
Amestec de enzime	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
Reactiv de culoare	4	4	4	4	4	4	4
Omogenizare eprubete, incubare 30 minute la temperatura camerei							
Absorbanța probelor la 436 nm față de blank	A _p	A _p	A _p	A _p	A _p	A _s	-

Calculul rezultatelor

$$\text{Glicemie (mg glucoză/100 mL)} = \frac{A_p}{A_s} * 100 \quad (4.12)$$

	Timp				
	0 minute	30 minute	60 minute	90 minute	120 minute
Glicemie, mg glucoză/mL					

Se reprezintă grafic variația glicemiei în funcție de timp și se compară curba obținută cu profilul curbelor din Figura 4.4.

**Figura 4.4.** Profile ale testului de toleranță la glucoză**Interpretarea rezultatelor**

La persoanele sănătoase, după administrarea orală a glucozei răspunsul insulenic apare rapid, vârful atingându-se după 30-60 minute. Dacă pancreasul funcționează normal, va secreta o cantitate suficientă de insulină care va metaboliza glucoza administrată, concentrația de insulină revenind la normal în aproximativ 2-3 ore. În cazul acestor pacienți, nivelul crescut al glicemiei este

tranzitoriu și nu apare glicozurie. La pacienții cu insuficiență insulinică și/sau rezistență periferică la insulină apare o creștere semnificativă a glicemiei la 2 ore.

În stabilirea diabetului gestațional, se consideră diabet de sarcină dacă cel puțin una din cele trei glicemii este mai mare sau egală cu pragul stabilit (Asociația Americană de Diabet)

	Glicemie à jeun	Glicemie la 2 ore
	mg/dL	mg/dL
Valori de referință	< 110	< 140
Toleranță alterată	110 – 126	140 – 199
Diabet zaharat	> 126	> 200

Valori mici ale parametrilor TTGO apare în: hipotiroidie, boala Addison, hipoparatiroidie, afecțiuni ale pancreasului (hiperplazia celulelor insulare pancreatice, tumori ale celulelor insulare pancreatice), hipoglicemie reactivă.

Valori ridicate ale parametrilor TTGO se întâlnesc în: sindrom Cushing, pancreatită acută, diabet zaharat, diabet gestațional, reacția Somogyi (hipoglicemie urmată de hiperglicemie reactivă, prin reacția exagerată a insulinei la încărcarea cu glucoză), răspuns la stres acut (infecții, arsuri, intervenție chirurgicală), terapie cu diuretice, mixedem, gastrectomie.

Dozarea glucozei serice - Metoda titrimetrică Hagedorn-Jensen

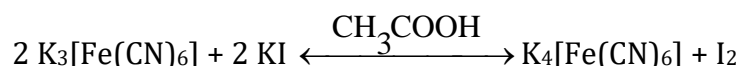
Principiul lucrării

Metoda are la bază precipitarea proteinelor serice cu hidroxid de zinc și implicarea zaharurilor reducătoare din supernatant în reacție cu un exces de $K_3[Fe(CN)_6]$. Cantitatea de $K_3[Fe(CN)_6]$ neredusă se determină iodometric (Sobotka și Reiner, 1930).

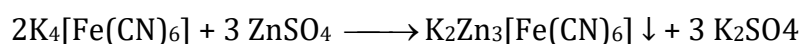
(1) Reacția glucozei prezente în serul deproteinizat și fericianura de potasiu adăugată în exces:



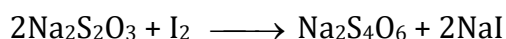
(2) Excesul de $K_3[Fe(CN)_6]$ reacționează cu iodul din iodura de potasiu în mediu acid:



(3) Pentru a se asigura deplasarea echilibrului reacției spre dreapta, ferocianura formată este precipitată:



(4) Iodul eliberat se titrează cu tiosulfat de sodiu în prezența amidonului ca indicator:



Aparatură și reactivi

- Sânge: sânge venos recoltat *à jeun* în vacutainer fără anticoagulant cu/fără gel separator sau, de preferat vacutainer cu NaF/Na₂EDT (previne coagularea sângelui și inhibă glicoliza).
- NaOH N/10
- ZnSO₄ 0,45 % (păstrare aproximativ trei săptămâni)
- K₃[Fe(CN)₆] N/200 (1,65 g fericianură de potasiu pură, 10,6 g carbonat de sodiu pur anhidru și apă distilată până la semn la 1000 mL)
- ZnSO₄ - NaCl (100 g sulfat de zinc, 500 g clorură de sodiu și apă distilată până la 1600 mL)
- KI 2,5 %
- CH₃COOH 3 % (3 mL acid acetic glacial, H₂O distilată până la 100 mL)
- Reactivul KI - ZnSO₄ - NaCl: 5 mL KI 2,5% + 20 mL sol ZnSO₄ - NaCl
- Amidon 1%
- KIO₃ N/200 F KIO₃ = 1,000
- Na₂S₂O₃ N/200: factorul soluției (F) se verifică prin titrare cu soluția de KIO₃ N/200
- Instalație de titrare
- Sticlărie de laborator

Modul de lucru

Se prepară soluțiile conform Tabelului 4.9.

Tabelul 4.9. Compoziția soluțiilor pentru dozarea titrimetrică a glucozei serice

Reactivi	Proba 1	Proba 2	Blank 1	Blank 2
Deproteinizare:absorbția proteinelor coagulate din sânge de către precipitatul de Zn(OH) ₂				
NaOH +ZnSO ₄ , mL	1+5	1+5	1+5	1+5
Ser, mL	0,1	0,1	-	-
Imersie în baie de apă clocotită, fierbere 5 minute, filtrare. Spălare eprubete de 2 ori cu câte 3 mL apă distilată fiartă, colectare și filtrare ape de spălare, Colectare filtrate				
2. Reducerea fericianurii				
Filtrat, mL	12,1	12,1	12,1	12,1
Fericianura de potasiu, mL	2	2	2	2
Agitare, încălzire 15 minute în baie de apă la fierbere, răcire în curent de apă rece				
KI - ZnSO ₄ - NaCl, mL	2	2	2	2
CH ₃ COOH, mL	2	2	2	2
Amidon, mL	2	2	2	2
Omogenizare				
Titrare cu Na ₂ S ₂ O ₃ până la dispariția culorii albastre, mL	v ₁	v ₂	v ₃	v ₄
Medie aritmetică	$V_1 = (v_1+v_2)/2$		$V_2 = (v_3+v_4)/2$	
Corecția de factor a soluției de Na ₂ S ₂ O ₃	$V_1 \cdot F$		$V_2 \cdot F$	

Calculul rezultatelor

Din Tabelul 4.10 se extrage glicemia (mg/100 mL sânge) corespunzătoare volumului de tiosulfat folosit la titrarea probelor de analizat ($V_1 \cdot F$) și respectiv blank-urilor ($V_2 \cdot F$):

Tabelul 4.10. Corelația dintre volumul de $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ folosit la titrare și glicemie (mg glucoză/100 mL)

$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	385	382	379	376	373	370	367	364	361	358
0,1	355	352	350	348	345	343	341	338	336	333
0,2	331	329	327	325	323	321	318	316	314	312
0,3	310	308	306	304	302	300	298	296	294	292
0,4	290	288	286	284	282	280	278	276	274	272
0,5	270	268	266	264	262	260	259	257	255	253
0,6	251	249	247	245	243	241	240	239	236	234
0,7	232	230	228	226	224	222	221	219	217	215
0,8	213	211	209	208	206	204	202	200	199	197
0,9	195	193	191	190	188	186	184	182	181	179
1,0	177	175	173	172	170	168	166	164	163	161
1,1	159	157	155	154	152	150	148	146	145	143
1,2	141	139	138	136	134	132	131	129	127	125
1,3	124	122	120	119	117	115	113	111	110	108
1,4	106	105	102	101	99	97	95	93	92	90
1,5	88	86	84	83	81	79	77	75	74	72
1,6	70	68	66	65	63	61	59	57	56	54
1,7	52	50	48	47	45	43	41	39	38	36
1,8	34	32	31	29	27	25	24	22	20	19
1,9	17	15	14	12	10	8	7	5	3	2

Na ₂ S ₂ O ₃	0,00	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,07	0,08	0,09
0,0	385	382	379	376	373	370	367	364	361	358
0,1	355	352	350	348	345	343	341	338	336	333
0,2	331	329	327	325	323	321	318	316	314	312
0,3	310	308	306	304	302	300	298	296	294	292
0,4	290	288	286	284	282	280	278	276	274	272
0,5	270	268	266	264	262	260	259	257	255	253
0,6	251	249	247	245	243	241	240	239	236	234
0,7	232	230	228	226	224	222	221	219	217	215
0,8	213	211	209	208	206	204	202	200	199	197
0,9	195	193	191	190	188	186	184	182	181	179
1,0	177	175	173	172	170	168	166	164	163	161
1,1	159	157	155	154	152	150	148	146	145	143
1,2	141	139	138	136	134	132	131	129	127	125
1,3	124	122	120	119	117	115	113	111	110	108
1,4	106	105	102	101	99	97	95	93	92	90
1,5	88	86	84	83	81	79	77	75	74	72
1,6	70	68	66	65	63	61	59	57	56	54
1,7	52	50	48	47	45	43	41	39	38	36
1,8	34	32	31	29	27	25	24	22	20	19
1,9	17	15	14	12	10	8	7	5	3	2

$$\text{Glicemie (mg glucoză/100 mL)} = \text{glicemia probei de analizat} - \text{glicemia blank-ului} \quad (4.13)$$

$$\text{Glicemie (mmoli/L)} = \text{mg glucoză/100 mL} \times 10/180 = \text{mg glucoză/100 mL} \times 0,555 \quad (4.14)$$

unde:

180 – masa moleculară a glucozei.

Determinare glucozei serice folosind spectrofotometrul BioSystems BTS-350

Principiul metodei

Metoda are la bază descompunerea glucozei în prezenta glucoxidazei până la gluconat și apă oxigenată. Apa oxigenată rezultată este implicată în reacția cu 4-aminoantipirină și fenol în prezenta peroxidazei cu obținerea unui complex colorat a cărui intensitate se citește spectrofotometric.

Aparatură și reactivi

- Reactiv A: fosfat 100 mmol/L, fenol 5 mmol/L, glucoxidază > 10 U/L, peroxidază > 1 U/L, 4-aminoantipirină 0,4 mmol/L, pH = 7,5

- Standard: standard glucoză/uree/creatinină: glucoză 100 mg/dL (5.55 mmol/L), uree 50 mg/dL, creatinină 2 mg/dL în apă
- Spectrofotometry Bystems-350
- Sticlărie de laborator

A. Pregătirea probelor: se pregătesc soluțiile conform Tabelului 4.11 (Figura 4.5):

Tabelul 4.11. Compoziția soluțiilor pentru dozarea colesterolului liber și esterificat

Reactiv	Blank	Standard	Ser control biochimic I	Ser control biochimic II	Probă
Standard glucoză(S)	-	10 μ L	-	-	-
Ser de control biochimic de nivel I (normal)	-	-	10 μ L	-	-
Ser de control biochimic de nivel II (patologic)	-	-	-	10 μ L	-
Proba de analizat	-	-	-	-	10 μ L
Reactiv A	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Se omogenizează probele și se incubează timp de 10 minute la 16-25°C sau 5 minute la 37°C (cronometrare timp de incubare).					
Se citește absorbanta probelor la 500 nm față de Blank	-	A _S	A _{SI}	A _{SII}	A _P

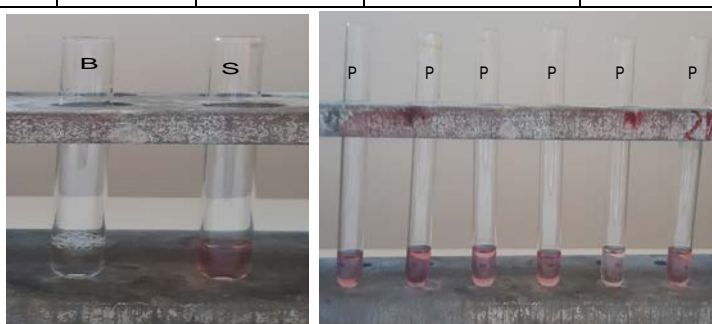


Figura 4.5. Dozarea glucozei serice

B – blank, S- standard, P – probe

B. Utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350:

B.1. Introducerea/Verificarea metodei de analiză -introduce/ verifică parametrii specifici analizării analitului: concentrațiile standardelor, blank, controlul, liniaritatea metodei, numărul de replici, unitatea de măsură, lungimea de undă folosită la citire, etc.

B.2. Măsurarea concentrației analitului investigat în probe citește absorbanțele probelor și standardului în raport cu blank-ul și afișează rezultatul.

În Anexa 3.1. se exemplifică utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350 la analiza acidului uric urinar. Pentru dozarea colesterolului, se parcurg aceiași pași, alegând din meniurile *Programare* și *Concentrații* metoda pentru Colesterol.

Calculul rezultatelor

$$\text{Conc. glucoză} = \frac{A_P}{A_S} \times C_{\text{standard}} \quad (4.15)$$

Folosind standardul cu concentrația 100 mg/dL, relația va avea forma:

$\frac{A_P}{A_S}$	x 100 = mg/dL glucoză x 5,55 = mmol/dL glucoză
-------------------	---

Observații

- valori de referință orientative:

Ser și plasmă

Copii, adulți	60 – 100 md/dL = 3,30 – 5,60 mmol/L
---------------	-------------------------------------

Fluid cerebrospinal

Adulți	40 – 70 md/dL = 2,22 – 3,89 mmol/L
--------	------------------------------------

Determinarea activității catalazei sanguine - Metoda Bach-Zubkova

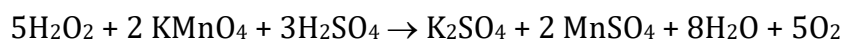
Aspecte generale

Catalaza (oxidoreductază) este un complex hem-proteină care alături de peroxidază descompune apa oxigenată cu formare de apă și oxigen. Aceasta se regăsește în principal în celulele roșii și hepatice. În organismul uman, catalaza are rol de detoxifiere a eritrocitelor, descompunând apa oxigenată din rezultată în urma acțiunii enzimei superoxid dismutază asupra purinelor și acizilor grași.

Principiul metodei

Catalaza este o enzimă localizată în mitocondrii și peroxizomi care catalizează descompunerea apei oxigenate cu formare de apă și oxigen. Metoda Bach-Zubkova dozează

permanganometric cantitatea de peroxid de hidrogen rezultat după acțiunea catalazei asupra lui, iar prin diferență dintre cantitățile folosite la titrare se calculează activitatea enzimei (Pintea și colab., 2008):



Aparatură și reactivi

- Sânge: sânge venos recoltat *à jeun* în vacutainer fără anticoagulant, cu/fără gel separator sau (de preferat vacutainer NaF/Na₂EDT)

- Soluție H₂O₂ 1%
- Soluție H₂SO₄ 10%
- Soluție KMnO₄ 0,1N;
- Instalație de titrare
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

50 mL apă distilată se amestecă cu 0,1 mL sânge proaspăt recoltat și se aduce la volum de 100 mL cu apă distilată. În 2 flacoane Erlenmayer de 50 mL se prepară probele conform Tabelului 4.12.

Tabelul 4.12. Compoziția soluțiilor folosite la dozarea catalazei sanguine

Reactivi	Proba martor	Proba de analizat
Sânge diluat, mL	-	1
Apă distilată, mL	7	7
H ₂ O ₂ 1%, mL	2	2
Se mențin probele în baie de apă rece (10-17°C) timp de 10 minute pentru inactivarea catalazei de către endopeptidaze		
H ₂ SO ₄ 10%, mL	5	5
Titrare cu KMnO ₄ 0,1 N până la culoarea roz și se notează volumul folosit la titrare, mL	V _M	V _P

Calculul rezultatelor

Cifra catalazică se calculează cu relația:

$$\text{Indicele catalazic} = (V_M \times F - V_P \times F) \times 1,7 \quad (4.16)$$

unde:

F – factorul soluției de KMnO₄ 0,1N

1 mL soluție KMnO₄ 0,1 N corespunde la 1,7 mg H₂O₂

Observații:

Valoarea normală a cifrei catalazice pentru sânge este 40-50. Valori scăzute apar în afecțiuni hepatice, la iradiere, cancer, anemie, cașexie.

Dozarea hemoglobinei din sânge sub formă de oxihemoglobină**Aspecte generale**

Culoarea roșie a sângelui este dată de un pigment care conține fier denumit hemoglobină al cărei rol este de a fixa oxigenul din aerul inspirat și de a-l transporta la celulele din organism. În circulația sanguină hemoglobina apare sub mai multe forme: deoxihemoglobina (HHb), oxihemoglobina (O₂Hb), carboxihemoglobina (COHb) și methemoglobina (MetHb). Importanță pentru diagnosticul unor forme de anemii o prezintă dozarea hemoglobinei din sângele total.

Principiul lucrării

Metoda se bazează pe hemoliza globulelor roșii în prezența amoniacului și transformarea hemoglobinei în oxihemoglobină care are maximul de absorbție la $\lambda = 540 \text{ nm}$ (Albu, 2001).

Aparatură și reactivi

- Sânge
- Soluție NH₃ 0,1%
- Concentrat de eritrocite cu concentrație cunoscută de hemoglobină; în absența standardului eritrocitar se poate obține dreapta de calibrare conform metodei bazate pe dozarea fierului eritrocitar
- Pipetă de hemoglobină de 0,02 mL
- Spectrometru UV-VIS

Mod de lucru

A. Pregătirea soluțiilor: se pregătesc soluțiile indicate în Tabelul 4.12.

Tabelul 4.12. Compoziția soluțiilor pentru dozarea hemoglobinei în sânge

Reactivi	Proba de analizat	Blank
Soluție de amoniac, mL	5	5
Sânge, mL	0,02	-
Apă distilată, mL	-	0,02
Omogenizare		
Absorbanța la 540 nm față de blank	Ap	-

B. Construcția dreptei de calibrare: se prepară standardele conform Tabelului 4.13.

Tabelul 4.13. Compoziția etaloanelor pentru construirea dreptei de calibrare

Reactivi	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4
Concentrat de eritrocite, mL	0,1	0,3	0,5	1
Apă distilată, mL	10	10	10	10
Omogenizare				
Absorbanța la 540 nm față de blank	A1	A2	A3	A4

Se construiește dreapta de calibrare Absorbanța = f(concentrația standardului) și se determină ecuația care descrie variația.

Calcul rezultatelor

Pornind de la ecuația de variație extrasă din dreapta de calibrare și valoarea absorbantei probei de analizat se calculează concentrația hemoglobinei în sânge.

Identificarea pigmentilor sanguini - Metoda spectrofotometrică

Aspecte generale

Principalii pigmenti ai sângelui sunt oxihemoglobina (HbO₂) și hemoglobina redusă (Hb – însoțește oxigemoglobina în sângele venos iar singură apare în cadavre). În situații speciale (intoxicații, stări patologice) aceștia pot trece în carboxihemoglobină (HbCO – hemoglobină combinată cu CO față de care afinitatea este mult mai ridicată comparativ cu afinitatea față de oxigen), methemoglobina (produs de oxidare al hemoglobinei în care fierul are starea de oxidare 3+) și hematina (formată în urma hidrolizei oxihemoglobinei).

Principiul lucrării

Metoda are la bază identificarea benzilor de absorbție specifice fiecăruia dintre pigmenti, prezentă datorita structurii specifice ale acestora (Pintea, 2008):

Tabelul 4.14. Benzile de absorbție caracteristice pigmentilor sanguini

Pigmentul	Benzile de absorbție caracteristice
Oxihemoglobina (HbO)	578 nm (in galben) și 542 nm (in verde)
Hemoglobina redusă (Hb)	In mediu acid: 639 nm – puternică și 3 benzi mai slabe la 584 nm, 543 nm și 504 nm; In mediu bazic: 581 nm puternică și 2 benzi slabe la 621 nm și 542 nm
Methemoglobina	633 nm, 578 nm, 542 nm
Carboxihemoglobina (HbCO)	570 nm și 539 nm

Aparatură și reactivi

- Sânge integral
- Acid oxalic
- Acid sulfuric concentrat
- Reactiv Stokes proaspăt preparat: 5 g acid tartric + 25 g sulfat feros în 50 mL apă distilată se tratează cu sol. conc. de NH_4OH concentrată până la reacție alcalină-culoare albastră-verde
- Spectrofotometru UV-VIS
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru**A. Trasarea spectrului hemoglobinei (HbO_2)**

Într-o cuvetă se pun 3-4 picături de sânge și se trasează spectrul de absorbție pe domeniul 480 ÷ 700 nm.

B. Trasarea spectrului carboxihemoglobinei (HbCO)

Benzile de absorbție ale HbCO sunt asemănătoare cu cele ale oxihemoglobinei, cele două putând însă fi identificate pe baza spectrelor de absorbție. Pentru evidențierea spectrelor HbO_2 și HbCO se folosesc două eprubete: într-o eprubetă se pune sânge normal iar în alta sânge cu CO (obținut prin barbotarea de CO provenit din reacția dintre acid oxalic și acid sulfuric concentrat) și se tratează spectrele lor. În ambele eprubete se adaugă câte trei picături de reactiv Stokes (oxihemoglobina se transformă în hemoglobină redusă, carboxihemoglobina nu se transformă) și se trasează din nou spectrele după 10 minute. Se analizează numărul benzilor de absorbție pentru fiecare tip de sânge în parte.

C. Trasarea spectrului hemoglobinei reduse (Hb)

Peste 3-4 picături de sânge diluat se adaugă 2-4 picături reactiv Stokes până când culoarea devine violacee și se trasează spectrul de absorbție.

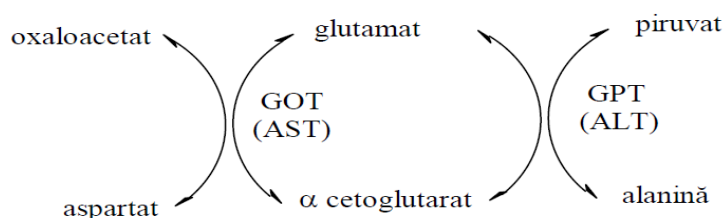
Se analizează comparativ spectrele obținute.

Determinarea activității transaminazelor**Metoda colorimetrică cu 2,4-dinitrofenilhidrazină****Principiul metodei**

Aminotransferazele (transaminazele) sunt enzime produse de celulele ficatului care catalizează sinteza aminoacizilor (precursori ai proteinelor). Când ficatul este afectat eliberează

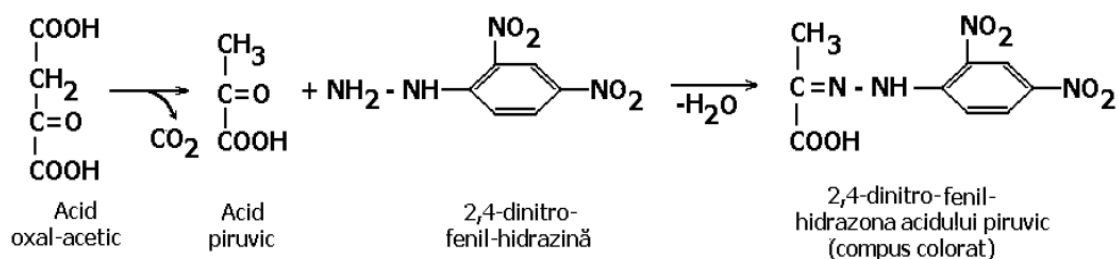
numite enzime în sange, iar nivelurile proteinelor produse de ficat încep să scadă. Prin măsurarea valorilor acestor enzime și proteine se poate crea o imagine de ansamblu a funcționalității ficatului.

Transaminazele au rol de catalizator al reacției prin care se transferă gruparea amino de la un alfa-aminoacid la un alfa-cetoacid. Mare importanță clinică prezintă: glutamic-oxalacetic-transaminaza (GOT, aspartat aminotransferaza-AST) și glutamicpiruvic-transaminaza (GPT, alanin aminotransferaza-ALT) care catalizează următoarele procese reversibile (Albu, 2001):



GOT este o enzimă localizată majoritar (60%) în citoplasmă și mitocondrii (40%), predominant în mușchiul scheletic, miocard și ficat. Sub acțiunea GTP gruparea $-NH_2$ se transferă ireversibil de la un aminoacid (alanina) α -cetoglutaratului cu formare de acid piruvic și glutamat. Apare în principal în ficat (la nivelul celulei hepatice în special în citosol) și în rinichi, miocard, mușchi scheletici și pancreas.

În cazul reacțiilor catalizate de către GOT substratul folosit este amestecul aspartat- α -cetoglutarat care se va descompune la oxalacetat și glutamat. Oxalacetatul se decarboxilează spontan trecând în piruvat. În cazul enzimei GPT se folosește ca substrat amestecul alanina- α -cetoglutarat cu formare de piruvat. Acesta interacionează în mediu alcalin cu 2,4-dinitrofenilhidrazina formând dinitro-fenilhidrazona corespunzătoare, un compus de culoare roșie a cărei intensitate se determină fotometric la 520 nm. Activitatea transaminazelor se evaluează în raport cu cantitatea de acid piruvic care se generează în interval de 1 minut.



La formarea compusului colorat contribuie și alfa-cetoglutaratului ceea ce înseamnă că metoda nu este specifică. În plus, temperatura la care se aplică metoda nu este standard ($37^\circ C$ în loc de $25^\circ C$). Din acest motiv, rezultatele obținute se corectează cu factori de corecție.

Aparatură și reactivi

- Ser sanguin: se recoltează sânge venos *à jeun* în vacutainer fără anticoagulant cu/fără gel separator și se separă serul prin centrifugare. Se respinge specimenul intens hemolizat, lipemic sau contaminat bacterian

- Substrat GOT: 1,50 g K₂HPO₄, 0,20 g KH₂PO₄, 0,039 g alfacetoglutarat de sodiu (sau 0,030 g acid alfa-cetoglutamic) și 1,57 g aspartat de sodiu (sau 1,32 g acid aspartic) se dizolvă în 80 mL apă distilată. Se aduce soluția la pH = 7,4 cu NaOH 0,4N și se aduce la semn la 100 mL cu apă distilată

- Substrat GPT: 1,50 g K₂HPO₄, 0,20 g KH₂PO₄, 0,030 g acid alfacetoglutamic (sau 0,039 g alfa-cetoglutarat de sodiu) și 1,78 g alanină se dizolvă în 80 mL apă distilată, se aduce pH-ul soluției la 7,4 cu NaOH 0,4N, apoi se completează la 100 mL cu apă distilată.

- Soluție de 2,4-dinitro-fenil-hidrazină 1 mM în HCl 2M: se dizolvă 19,8 mg dinitro-fenil-hidrazină în 10 mL HCl (d = 1,19 g/cm³) și se completează la 100 mL cu apă distilată.

- Soluție standard de piruvat de sodiu 2 mM: se dizolvă în 100 mL apă distilată 22 mg piruvat de sodiu (1 mL soluție conține 2 μmoli piruvat). Se adaugă 0,3 mL cloroform pentru conservare.

- Soluție NaOH 0,4N

- Spectrofotmetru UV-VIS

- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

Se pregătesc 3 eprubete atât pentru GOT cât și pentru GPT: probă (P), standard (S) și blank (B) în care se adaugă reactivii indicați în Tabelul 4.15.

Tabelul 4.15. Compoziția soluțiilor pentru măsurarea activității GOT și GPT

Reactivi	GOT			GPT		
	Probă	Standard	Blank	Probă	Standard	Blank
Soluție substrat GOT, mL	0,5	0,5	0,5	-	-	-
Soluție substrat GPT, mL	-	-	-	0,5	0,5	0,5
Se incubează 5 minute la 37°C						
Ser, mL	0,1	-	-	0,1	-	-
Soluție standard piruvat de sodiu, mL	-	0,1	-	-	0,1	-
Incubare la 37°C	60 minute			30 minute		
Soluție 2,4-dinitrofenilhidrazină, mL	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
Ser, mL	-	-	0,1	-	-	0,1
Soluție NaOH, mL	5	5	5	5	5	5
Omogenizare, repaos 5 minute						
Absorbanța la 520 nm în raport cu blank-ul	Ap	As	-	Ap	As	-

Calculul rezultatelor

Activitate enzimatică GOT ($\mu\text{moli piruvat format/min.}/1000 \text{ mL ser în condițiile de lucru}$)

$$X = (A_p/A_s) \cdot 0,2 \cdot (1/60) \cdot (1/0,1) \cdot 1\,000 \quad (4.17)$$

Activitate enzimatică GPT ($\mu\text{moli piruvat format/min.}/1000 \text{ mL ser în condițiile de lucru}$)

$$X = (A_p/A_s) \cdot 0,2 \cdot (1/30) \cdot 1\,000 \quad (4.18)$$

Corecția datelor experimentale

Pentru a corela rezultatele experimentale obținute prin metoda colorimetrică cu datele obținute prin metoda de referință (care exprimă activitatea enzimatică reală) și a exprima aceste rezultate în Unități Internaționale (UI = $\mu\text{moli/min.}/L$, 25°C) se folosește Tabelul 4.16.

Tabelul 4.16. Corelație între rezultatele experimentale obținute prin metoda colorimetrică cu datele obținute prin metoda de referință

UI			UI			UI			UI		
X	GOT	GPT	X	GOT	GPT	X	GOT	GPT	X	GOT	GPT
2	2	1	26	23	9,5	54	60	23	80		38
4	3	2	28	25	10	56		24	82		39
6	5	2,5	30	27	11	58		25	84		40
8	6	3	32	29	12	60		26	86		42
10	7	4	34	31	13	62		27	88		44
12	9	4,5	36	33	14	64		29	90		46
14	11	5	38	35	15	66		30	92		48
16	13	6	40	37	16	68		31	94		50
18	15	7	42	39	17	70		33	96		52
20	17	7,5	44,46	41,44	18,19	72		34	98		54
22	19	8	48	47	20	74		35	100		56
23	20	8,5	50	51	21	76		36	102		60
24	21	9	52	55	22	78		37			

Observații:

1. Dacă activitatea enzimatică > 60 UI se repetă determinarea folosind incubația scurtă de 20 de minute pentru GOT și 10 minute pentru GPT. Rezultatele obținute se înmulțesc cu 3. Se recomandă ca în locul reducerii timpului de incubație să se dilueze seul în apă distilată 1:5, 1:10, 1:20 în apă distilată și să se reia pentru fiecare diluție tehnica de lucru de la început

2. Urmele de detergenți pot inhiba semnificativ activitatea enzimatică, de aceea se recomandă ca sticlăria folosită să fie perfect curată și spălată cu multă apă distilată

Determinarea activității fosfatazei alcaline

Aspecte generale

Fosfataza alcalină (ALP) este o enzimă care aparține clasei hidrolazelor (ortofosfomonoesterfosfohidrolaza) și apare sub forma a cel puțin șase izoenzime ale ALP în serul persoanelor sănătoase: intestinale (I), două izoforme osoase (B1 și B2), trei izoforme hepatice (L1, L2 și L3). Sub forma izoenzimei osoasă (B1x) apare în serul pacienților dializați. O formă tranzitorie (forma placentară) se sintetizează pe durata sarcinii. Enzima apare în toate țesuturile organismului, la nivelul membranelor celulare și în concentrații mari în ficat, epiteliului intestinal, placentei, tubulilor renali, osteoblastelor. Forma care există în serul sanguin al adulților provine în special din ficat și oase.

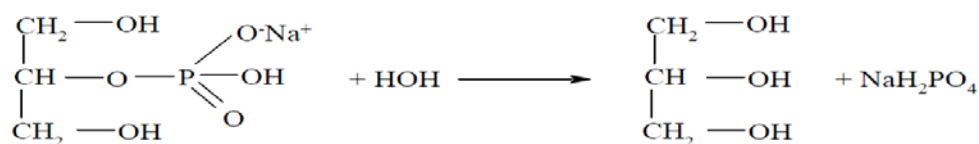
Dozarea fosfatazei alcaline este folosită pentru a diagnostica diferențial bolile hepatice, afecțiunile osoase și hiperparatiroidismul. Fosfataza alcalină este folosită ca marker tumoral în tumorile de diverse etiologii (identificarea metastazelor hepatice sau osoase). Intervalul optimă al pH-ului la care acționează fosfataza alcalină este 8,4 - 9,1.

Determinarea activității fosfatazei alcaline - Metoda Bodansky

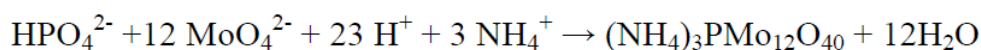
Principiul metodei

Metoda de dozare are la bază (McPherson, and Pincus, 2016; Albu, 2001, Laborator Synevoe (f), 2010) următoarele etape:

(1) Hidroliza β -glicerolfosfatul de sodiu sub acțiunea fosfatazei alcaline cu formare de fosfat monosodic:



(2) Fosfatul monosodic reacționează cu acidul molibdenic cu formarea complexului fosfomolibdenic care va fi redus de hidrochinonă și sulfitul de sodiu la albastru de molibden (amestec de oxizi de molibden cu stări de oxidare diferite):



(3) Intensitatea culorii albastre este direct proporțională cu cantitatea de molibden din fosfomolibdat și implicit cu cantitatea de fosfor din probă.

Aparatură și reactivi

-Ser sanguin: se recoltează sânge venos *à jeun* în vacutainer fără anticoagulant cu/fără gel separator și se separă serul prin centrifugare. Se respinge specimenul intens hemolizat, lipemic sau contaminat bacterian

- Soluție de substrat: în 50 mL apă distilată se dizolvă 0,5 g β -glicerolfosfat de sodiu (pH = 9,6), 0,425 g veronal sodic, 2,2 mL NaOH 0,1 N și se aduce la volum de 100 mL cu apă distilată

-NaOH N/10

-Hydrochinonă 1%

- Sulfid de sodiu 20%

- Acid tricloracetic 10%

- Molibdat de amoniu 2,5%

- Soluție etalon de fosfat: 4,3866 g KH_2PO_4 (p.a., uscat în exicator) se dizolvă în puțină apă și se aduce la volum de 1000 mL, se adaugă câteva picături de cloroform (conservant). Soluția conține 1 mg de fosfor/1 mL

- Soluție etalon de fosfat diluată: se diluează soluția etalon de fosfat de 50 de ori pentru a ajunge la concentrația 20 μg fosfor/1 mL.

- Spectrofotometru UV-VIS

- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

A. Trasarea dreptei de etalonare

Tabelul 4.17. Compoziția soluțiilor pentru trasarea dreptei de etalonare la dozarea fosfatazei alcaline

Reactiv	Nr. eprubetă					
	1	2	3	4	5	6
Soluție etalon diluată, mL	1	2	4	6	8	10
Acid tricloracetic, mL	4	4	4	4	4	4
Amestecare						
Volum amestec din fiecare eprubetă, mL	5	5	5	5	5	5
Molibdat de amoniu, mL	2	2	2	2	2	2
Hydrochinonă, mL	1	1	1	1	1	1
Sulfid de sodiu, mL	2	2	2	2	2	2
Timp de reacție: 5 minute						
Absorbanța la 610 nm						

Se reprezintă grafic Absorbanța = f(concentrația de fosfor: 5, 10, 20, 30, 40 50 μg) și se determină ecuația de variație.

B. Dozarea fosfatazei alcaline: se pregătesc probele conform Tabelului 4.18.

Tabelul 4.18. Compoziția soluțiilor pentru dozarea fosfatazei alcaline

Reactivi	Proba de analizat	Blank
Soluție de substrat	5 Menținere amestec 5 minute la 37°C	5
Ser	1 mL Se lasă astupată eprubeta cu amestec timp de 30 minute la 37°C	1 mL
Acid triclor acetic	4 mL	4 mL Inactivare enzimă
Agitare energetică 1-2 minute și filtrare		
Volum filtrat, mL	5 mL	5 mL
Soluție molibdat de amoniu	1 mL	1 mL
Soluție sulfat de sodiu	1 mL	1 mL
Hidrochinonă	1 mL	1 mL
Apă bidistilată	2 mL	2 mL
Repaos 2 minute		
Absorbanța probei față de martor la 610 nm		

Calcul rezultatelor

Din ecuația de variație care descrie dreapta de etalonare se citește concentrația de fosfor din proba de analizat care se transformă în *Unități Bodansky (UB)*.

O unitate Bodansky este activitatea fosfatazică pentru care 1 mg fosfor este eliberat într-o oră la 37° C și pH = 9,6 de 100 mL ser din substratul de β-glicerolfosfat.

Transformarea unităților Bodansky în unități internaționale (mU/mL sau UI/L) se face înmulțind cu factorul de conversie 8,3.

Determinarea activității fosfatazei alcaline folosind spectrofotometrul BioSystems BTS-350

Principiul lucrării

Metoda are la bază determinarea vitezei de formare a 4-nitrofenolului din 4-nitrofenolfosfat și 2-amino-2-metil-1-propanol (AMP) sub acțiunea fosfatazei alcaline (ALP) măsurată spectrofotometric la lungimea de undă de 405 nm.



Aparatură și reactivi

- Ser sau plasmă recoltate prin proceduri standard
- Reactiv A: 2-amino-2-metil-1-propanol 0,4 mol/L, sulfat de zinc 1,2 mmol/L, acid N-hidroxi-etilendiaminotriacetic 2,5 mmol/L, acetat de magneziu 2,5 mmol/L, pH 10,4
- Reactiv B: 4-nitrofenolfosfat 60 mmol/L
- Reactiv de lucru: amestecați 4 mL reactiv A cu 1 mL reactiv B
- Ser control biochimic nivel I (normal)
- Ser control biochimic nivel II (patologic)
- Spectrofotometru BTS-350
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru (cf. Prospect – Alkaline phosphatase, BioSystems 2022)

A. Pregătirea probelor: se prepară soluțiile conform Tabelului 4.19.

Tabelul 4.19. Prepararea soluțiilor pentru dozarea fosfatazei alcaline

Reactiv	Standard	Ser control biochimic I	Ser control biochimic II	Probă
Standard	20 μ L	-	-	-
Reactiv de lucru	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Ser control I (normal)	-	20 μ L	-	-
Ser control II (patologic)	-	-	20 μ L	-
Probă	-	-	-	20 μ L
Se citește absorbanta probelor la 405 nm la 30 secunde	A _{S30}	A _{SI30}	A _{SII30}	A _{P30}
Se citește absorbanta probelor la 405 nm la 60 secunde	A _{S60}	A _{SI60}	A _{SII60}	A _{P630}
Se citește absorbanta probelor la 405 nm la 90 secunde	A _{S90}	A _{SI90}	A _{SII90}	A _{P90}
Se citește absorbanta probelor la 405 nm la 120 secunde	A _{S120}	A _{SI120}	A _{SII120}	A _{P120}
Se citește absorbanta probelor la 405 nm la 150 secunde	A _{S150}	A _{SI150}	A _{SII150}	A _{P150}
Se citește absorbanta probelor la 405 nm la 180 secunde	A _{S180}	A _{SI180}	A _{SII180}	A _{P180}
Se calculează diferențele dintre absorbantele consecutive și media diferențelor dintre absorbantele pe minut $\Delta A/\text{min}$				

B. Utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350:

B.1. Introducerea/Verificarea metodei de analiză -introduce/ verifică parametrii specifici analizării analitului: concentrațiile standardelor, blank, controlul, liniaritatea metodei, numărul de replici, unitatea de măsură, lungimea de undă folosită la citire, etc.

B.2. Măsurarea concentrației analitului investigat în probe citește absorbanțele probelor și afișează rezultatul.

În Anexa 3.1. se exemplifică utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350 la analiza acidului uric urinar. Pentru dozarea fosfatezi alcaline se parcurg aceeași pași, alegând din meniurile *Programare* și *Concentrații* metoda pentru Fosfataza alcalină.

Calculul rezultatelor

Activitatea fosfatazei alcaline în probă se calculează cu relația:

$$\text{Activitate fosfatază alcalină (U/L)} = \Delta A/\text{min} * \frac{V_t * 10^6}{\epsilon * l * V_s} \quad (4.19)$$

unde:

ϵ – absorbanta molară a 4-nitrofenol la 405 nm = 18450

l – lungimea traseului luminos = 1 cm

V_t – volumul total de reacție = 1,02 mL

V_s – volumul probei = 0,02 mL

1 U/L – reprezintă 0,0166 $\mu\text{kat/L}$.

Inserând valorile în formulă, se obțin relațiile:

$\Delta A/\text{min}$	$\times 764 = \text{U/L}$
	$\times 46.08 = \mu\text{kat/L}$

Observații

Temperatura de reacție	Bărbați	Femei
37°C, până la	115 U/L = 1.92 $\mu\text{kat/L}$	105 U/L = 1.75 $\mu\text{kat/L}$

- valorile mari ale concentrației serice ale ALP au fost raportate la pacienții cu afecțiuni osoase legate de creșterea osteoblastelor (osteomalacie , boala Paget, fracturi osoase, etc.) și la pacienții cu afecțiuni hepatobiliare (hepatite, obstrucție biliară, hepatotoxicitate indusă de medicamente, cancer hepatic)

- modificările fiziologice (sarcina, creșterea oaselor) pot duce la valori ridicate ale nivelurilor serice ale ALP.

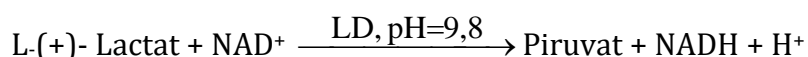
Dozare acid lactic seric - Metoda spectrofotometrică/enzimatică

Aspecte generale

Acidul lactic rezultă în celulele musculare și hematii în urma producerii anaerobe de energie (descompunerii carbohidraților la niveluri scăzute de oxigen – condiții de hipoxie sau funcționare necorespunzătoare a mitocondriilor) în cazul exercițiilor fizice intense sau infecțiilor. În prezența nivelului normal de oxigen carbohidrații se descompun în apă și dioxid de carbon. Acidul lactic format este ulterior metabolizat de către ficat și rinichi. Dozarea nivelului de acid lactic este un test premergător stabilirii diagnosticului de acidoză lactică, o boală caracterizată de un conținut ridicat de acid lactic în organism care nu poate fi metabolizat.

Principiul lucrării

Metoda are la bază oxidarea în mediu bazic a acidului lactic de către lactat dehidrogenaza și reacția piruvatului format cu hidrazina cu formarea unui compus colorat a cărui intensitate este direct proporțională cu cantitatea de acid lactic descompusă (White și colab., 2009; Laborator Synevovet; Laborator MedCenter (a, b)):



Aparatură și reactivi

- Sânge: se recoltează sânge venos sau arterial *a jeun* în vacutainer cu heparină (dop portocaliu), NaF sau indoacetat (dop gri) evitându-se aplicarea garoului sau strângerea pumnului; De asemenea, pacientul nu trebuie să depună efort fizic intens înainte pentru a evita creșterea temporară a nivelului de acid lactic din sânge; sângele se centrifughează și se recoltează plasma; se resping specimene intens hemolizate sau lipemice

- Lichid cefalorahidian centrifugat; proba este stabilă 24 h la 2-8 °C și 2 luni la -20°C

- Reactiv de culoare: 8 mL glicină 1 M, 0.4 mL lactat dehidrogenază ~400U/mL, 0.6 mL NAD (Nicotinamide Adenine Dinucleotide) 0,1 mM, 0.4 mL hidrazină 20 M, 5 mL apă deionizată (se prepară proaspăt)

- Soluție stoc de standard lactat : 20 mM: 192 mg de Litiu L-(+)- Lactat se dizolvă în 100 mL apă distilată

- Soluții de lucru de standard lactat : soluția stoc de standard se diluează pentru a obține concentrații de 0,625 ; 1,25 ; 2,5 ; 5 ; 10 și 15 mM

- Spectrometru UV-VIS
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

A. Construirea dreptei de etalonare: se citesc absorbanțele soluțiilor de lucru standard lactat la 340 nm și se construiește graficul Absorbanța = f(concentrația soluțiilor de lucru standard lactat). Se extrage dreapta de variație.

B. Dozarea acidului lactic: se prepară probele de analizat conform Tabelului 4.19.

Tabelul 4.19. Compoziția soluțiilor pentru dozarea acidului lactic

Reactivi	Proba de analizat	Blank
Ser, μL	25	-
Apă distilată, μL	-	25
Reactiv de culoare, mL	1	1
Omogenizare		
Absorbanța la 340 nm în raport cu blank-ul	Ap	-

Calculul rezultatelor

Pe baza ecuației de variație a dreptei de calibrare și absorbantei probei de analizat se determină concentrația acidului lactic în probă și apoi în volumul de sânge analizat.

Dozarea ureei serice

Aspecte generale

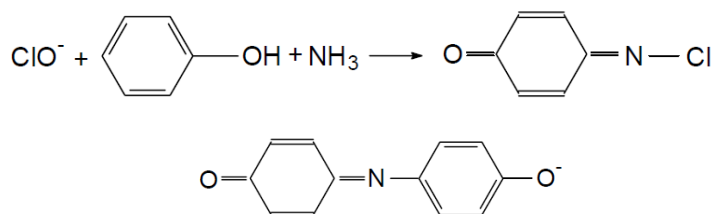
Ureea provine din degradarea în stomac și intestine a aminoacizilor sub acțiunea enzimelor proteolitice. Organul principal în care se formează ureea este ficatul. Aproximativ 50% din uree se reabsoarbe în sânge, iar 50% se elimină prin filtrare glomerulară.

Nivelul ureei serice ajută diagnosticarea: insuficiențelor renale; diferențierea între azotemia prerenală și postrenală prin calcularea raportului uree/creatinină; monitorizarea dietelor hipoproteice în insuficiența renală cronică; monitorizarea hemodializei (Laborator Synevo (g), 2015; Richard și Pincus, 2016; Fischbach (a, b), 2009; Wallach (b), 2001; Lothar (b), 1998; Laboratory Corporation of America (b), 2010).

Dozarea ureei serice - Metoda spectrofotometrică/enzimatică

Principiul lucrării

Metoda are la bază hidrolizarea ureei din ser sub acțiunea ureazei. Amoniacul format este implicat într-o reacție în mediu bazic cu fenolul și hipocloritul de sodiu iar parachinoncloroimina rezultată reacționează cu o altă moleculă de fenol rezultând indofenolul colorat albastru intens în mediu alcalin. Nitroprusiatul de sodiu catalizează reacția (Albu, 2001).



Reactivi și echipamente

- Se recoltează sânge venos *à jeun* sau sau postprandial în vacutainer fără anticoagulant cu/fără gel separator și se separă serul prin centrifugare. Se respinge specimenul intens hemolizat, lipemic sau contaminat bacterian

- Ureeză tamponată: 1 g EDTA se dizolvă în 80 mL apă distilată, se aduce pH-ul la 6,5 cu NaOH diluat. Se adaugă 150 mg ureeă și se aduce la semn la 100 mL cu apă distilată

- Soluție etalon de uree: 40 mg uree p.a. (uscată în prealabil) se dizolvă în apă distilată și se aduce la volum de 100 mL

- Reactiv fenolic: 25 g fenol (p.a.) se dizolvă în 400 mL apă distilată. Separat, 125 mg nitroprusiat de sodiu se dizolvă în 50 mL apă distilată. Cele două soluții se amestecă și se aduce la semn la volum de 500 mL

- Reactiv hipoclorit: 12,5 g NaOH se dizolvă în 400 mL apă distilată, se adaugă un volum de hipoclorit comercial conținând 1,10 g hipoclorit de sodiu (în general 20 mL soluție) și se aduce la semn la volum de 500 mL

Mod de lucru

Se prepară soluțiile indicate în Tabelul 4.20.

Tabelul 4.20. Compoziția soluțiilor pentru dozarea ureei serice

Reactivi	Proba de analizat	Proba standard	Blank
Suspensie ureeă, mL	0,2	0,2	0,2
Ser, mL	0,02	-	-
Apă distilată, mL	-	-	0,02

Soluție uree, mL	-	0,02	-
Incubare la 37°C timp de 15 minute			
Reactiv fenolic, mL	1	1	1
Reactiv hipoclorit, mL	1	1	1
Incubare la 37°C timp de 15 minute			
Apă distilată, mL	10	10	10
Omogenizare			
Absorbanța la 630 nm	Ap	As	-

Dozarea ureei serice folosind spectrofotometrul BioSystems BTS-350

Se parcurg etapele menționate în secțiunea Dozarea ureei/BUN cu spectrofotometrul BioSystems BTS-350.

Dozarea acidului uric seric

Aspecte generale

Acidul uric este un produs final al metabolismului acizilor nucleici, bazelor purinice și nucleoproteinelor, fiind generat în principal de către mucoasa intestinală și ficat. Odată generat, este filtrat și excretat la nivelul rinichilor aproximativ 70%, restul fiind degradat în tractul gastrointestinal. În plasma sanguină și lichidul sinovial apare sub formă ionizată, în principal sub formă de urat monosodic. Dozarea acidului uric este recomandată în: diagnosticarea gutei, evaluarea sindromului metabolic, evaluarea insuficienței renale, monitorizarea pacienților cu leucemie, monitorizarea terapiei de sarcină toxică (Laborator Synevo (h), 2015; Richard și Pincus, 2016; Fischbach (a, b), 2009; Wallach (b), 2001; Lothar (c), 1998; Laboratory Corporation of America (c), 2010).

Principiul lucrării

Metoda are la bază reducerea reactivului fosfowolframic de către acidului uric în mediu bazic rezultând un compus albastru a cărui intensitate este direct proporțională cu concentrația acidului uric din probă (Albu, 2001).

Aparatură și reactivi

- Se recoltează sânge venos *à jeun* în vacutainer fără anticoagulant cu/fără gel separator și se separă serul prin centrifugare. Se respinge specimenul intens hemolizat, lipemic sau contaminat bacterian.

- Acid tricloracetic 20%

- Reactiv fosfowolframic: 50 g wolframat de sodiu, 40 mL H₃PO₄ 85% (d = 1,71 g/cm³) și 350 mL apă distilată se fierb lent 6 ore (în balon de 1000 mL prevăzut cu refrigerent cu reflux) și se răcește balonul. Conținutul acestuia se trece în balon cotat de 500 mL și se aduce la semn cu apă distilată. Dacă soluția este verde, se adaugă 1-2 picături de brom, se mai fierbe câteva minute (fără refrigerent) pentru a îndepărta exces de brom. Soluția rezultată are culoarea galben-verde deschis.



- Soluție Na₂CO₃ 22%

- Soluție bază de acid uric: 100 mg acid uric, 200 mg fosfat disodic și 100 mg fosfat monosodic se dizolvă în 60 mL apă distilată la 60°C și se omogenizează. După răcire se aduce la volum de 100 mL cu apă distilată. Soluția de bază se poate conserva prin adăugarea a 3-4 picături de cloroform și închidere ermetică prin parafinare (4-5 luni la temperatura de +4°C).

- Soluția standard de acid uric: 1 mL soluție de bază de acid uric se aduce la 100 mL cu apă distilată (concentrație finală 1 mg/100 mL).

Mod de lucru

A. Deproteinizarea serului: se omogenizează 2 mL ser, 4 mL apă bidistilată și 2 mL acid tricloracetic 20%. Se filtrează după 10 minute.

B. Reducerea reactivului fosfowolframic: se pregătesc soluțiile conform Tabelului 4.21.

Tabelul 4.21. Compoziția soluțiilor pentru dozarea acidului uric seric

Reactivi	Proba de analizat	Standard	Blank
Ser, mL	2,0	-	-
Soluție standard de acid uric, mL	-	2,0	-
Apă distilată, mL	-	-	2,0
Soluție Na ₂ CO ₃ , mL	0,9	0,9	0,9
Reactiv fosfowolframic, mL	0,1	0,1	0,1
Repaos 10 minute			
Absorbanta la 610 nm	Ap	As	

Calcul rezultatelor:

La un volum de 2 mL filtrat îi corespund 0,5 mL ser (diluția serului= 2/0,5 = 4)

$$\text{Acid uric (mg acid uric/100 mL ser)} = \text{Ap/As} \times 1 \times 4 \quad (4.20)$$

$$\text{mg \%} \times 60 = \mu\text{moli/L}$$

Observații:

În cazul în care proba prezintă opalescență este necesară centrifugarea înainte de măsurarea absorbanței.

Dozarea acidului uric seric - Metoda spectrofotometrică/enzimatică

Se parcurg etapele menționate în secțiunea Dozarea acidului uric urinar cu spectrofotometrul BioSystems BTS-350.

Dozarea albuminei serice folosind spectrofotometrul BioSystems BTS-350**Aspecte generale**

Albumina este proteina care are ponderea cea mai mare în ser (60%), jucând roluri importante în menținerea pH-ului și presiunii osmotice, transportul unor compuși cheie (acizi grași cu lanț lung, bilirubină, calciu, magneziu), antioxidant, anticoagulant.

Principiul metodei

Metoda are la bază reacția rapidă a albuminei cu verde de bromcrezol în mediu acid, cu formarea unui complex colorat verde-albastru a cărei intensitate, proporțională cu concentrația albuminei, se citește spectrofotometric.

Aparatură și reactivi

- Ser recoltat prin proceduri standard;
- Reactiv A: Tampon citrat 100 mmol/L, verde de bromcrezol 0.27 mmol/L, agenți tensioactivi, pH =4.1
- Standard albumină: Albumină bovină
- Ser calibrator de biochimie
- Ser de control pentru biochimie nivel I (normal)
- Ser control pentru biochimie nivel II (patologic)
- Spectrofotometru BioSystems BTS-350
- Centrifugă
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru (cf. Prospect - BioSystems Albumină, 2022)

A. Pregătirea probelor: se pregătesc soluțiile conform Tabelului 4.22.

Tabel 4.22. Prepararea soluțiilor folosite la dozarea albuminei

Reactiv	Blank	Standard	Ser control biochimic I	Ser control biochimic II	Probă
Standard albumină	-	10 μL	-	-	-
Ser control biochimic I (normal)	-	-	10 μL	-	-
Ser control biochimic II (patologic)	-	-	10 μL	-	-
Proba	-	-	-	-	10 μL
Reactiv A	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Se omogenizează eprubetele și se incubează la temperatura camerei (16-25°C) timp de 1 minut.					
Se citește absorbanta standardului și probelor la 630 nm	-	As	AsI	AsII	AP

B. Utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350:

B.1. Introducerea/Verificarea metodei de analiză -introduce/ verifică parametrii specifici analizării analitului: concentrațiile standardelor, blank, controlul, liniaritatea metodei, numărul de replici, unitatea de măsură, lungimea de undă folosită la citire, etc.

B.2. Măsurarea concentrației analitului investigat în probe citește absorbanțele probelor și standardului în raport cu blank-ul și afișează rezultatul.

În Anexa 3.1. se exemplifică utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350 la analiza acidului uric urinar. Pentru dozarea Albuminei, se parcurg aceiași pași, alegând din meniurile *Programare* și *Concentrații* metoda pentru Albumină.

Calculul rezultatelor

Concentrația HDL colesterol în proba de analizat afișată pe ecran este calculată cu relația:

$$\text{Albumină (g/L)} = \frac{\text{Abs_probă}}{\text{Abs_standard}} * \text{Conc_standard} \quad (4.21)$$

unde:

Abs_proba – absorbanta probei de analizat, adim

Abs_standard – absorbanta standardului, adim

Conc_standard – concentrația standardului, g/L

Valori de referință orientative pentru albumină

Nou-născuți (2-4 zile)	28 – 44 g/L
4 zile-14 ani	38 – 54 g/L

Adulți	35 – 50 g/L
> 60 ani	34 – 48 g/L

- Hipoalbuminemia este asociată cu: boala hepatică, reducerea absorbției aminoacizilor (malabsorbție sau malnutriție), boli renale (diabet zaharat), boli ale tractului gastrointestinal (colite, ulcere), dermatite ale pielii;

- Hiperalbuminemia are importanță diagnostică redusă, cu excepția deshidratării.

Observații

- reacția albuminei cu reactivul de culoare este imediată; nu se întârzie citirea pentru a nu permite interferența în reacția a altor proteine.

- interferă în analiză bilirubina (până la 30 mg/dL) și hemoliza (hemoglobina până la 400 mg/dL), unele medicamente

Dozarea proteinelor totale serice

Aspecte generale

Proteinele plasmatică, în marea lor majoritate sunt sintetizate în ficat, cu excepția imunoglobulinelor. Monitorizarea concentrației proteinelor plasmatică/serice (proteinemie) furnizează informații despre starea de afectare a unui organ.

Dozarea proteinelor totale serice - Metoda biuret

Principiul metodei

Metoda are la bază reacția dintre proteine și ionii de Cu^{2+} formând un complex proteic de culoare albastră a cărei intensitate se citește spectrofotometric la lungimea de undă 540 nm (Albu, 2001). *Biuretul* este cel mai simplu compus care participă la această reacție, fiind rezultat din descompunerea ureei.

Calcul rezultatelor:

$$\text{Proteine în ser (g/100 mL)} = \frac{A_p}{A_{\%}} \times \frac{V_F}{V_P} = \frac{A_p}{2,77} \times \frac{5,1}{0,1} = A_p \times 18,4 \quad (4.22)$$

unde:

A% - coeficient de absorbanță procentual

V_F – volumul final al probei, mLV_p – volumul probei de analizat, mL**Dozarea proteinelor totale serice folosind spectrofotometrul BioSystems BTS-350 (BIURET)****Principiul metodei**

Metoda are la bază reacția dintre proteinele din proba de analizat cu ionii Cu²⁺ în mediul alcalin cu formarea unui complex colorat albastru a cărui absorbanță se citește spectrofotometric la lungimea de undă 545 nm.

Aparatură și reactivi

- Ser sau plasma heparinizate recoltate prin proceduri standard
- Reactiv A: conține acetat de cupru (II) 6 mmol/L, KI 12 mmol/L, NaOH 1.15 mol/l, detergent
- Standard S: albumină bovină
- Ser control biochimie I, ser control biochimie II (pentru verificarea performanței metodei)
- Spectrofotometru BioSystems BTS-350
- Baie de apă termostatabilă la 37°C
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru (cf. Prospect – Proteine (total), 2022)

A. Pregătirea probelor: se pregătesc soluțiile conform Tabelului 4.23.

Tabelul 4.23. Pregătirea soluțiilor folosite la dozarea proteinelor totale serice

Reactivi	Blank	Standard	Proba
Apa distilată	20 μL	-	-
Standard proteine (S)	-	20 μL	-
Proba	-	-	20 μL
Reactiv A	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Omogenizare, repaos 10 minute			
Absorbanța la 545 nm în raport cu blank-ul	A _p	A _s	-

B. Utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350:

B.1. Introducerea/Verificarea metodei de analiză -introduce/ verifică parametrii specifici analizării analitului: concentrațiile standardelor, blank, controlul, liniaritatea metodei, numărul de replici, unitatea de măsură, lungimea de undă folosită la citire, etc.

B.2. Măsurarea concentrației analitului investigat în probe: citește absorbanțelor probelor și standardului în raport cu blank-ul și afișarea rezultatului.

În Anexa 3.1. se exemplifică utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350 la analiza acidului uric urinar. Pentru dozarea Proteinelor totale, se parcurg aceiași pași, alegând din meniurile *Programare* și *Concentrații* metoda pentru Proteine.

Calculul rezultatelor

Concentrația proteinelor în probă se calculează cu relația:

$$\text{Concentrație proteine (g/L)} = \frac{\text{Abs_probă}}{\text{Abs_standard}} * \text{Conc_standard} \quad (4.23)$$

unde:

Abs_proba – absorbanta probei de analizat, adim

Abs_standard – absorbanta standardului, adim

Conc_standard – concentrația standardului, g/L

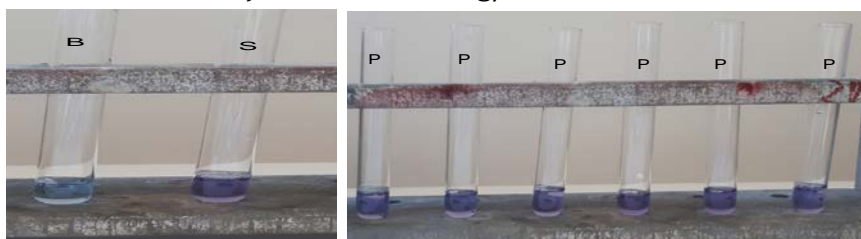


Figura 4.6. Dozarea proteinelor totale serice

B – blank, S – standard, P - probe

Valori de referință orientative pentru proteine serice totale

Ser:

Adulți

Ambulatoriu 64 – 83 g/L

În repaos 60 – 78 g/L

Copii

Valori mai scăzute decât la adulți

Plasmă

Concentrațiile proteinelor în plasmă sunt mai mari cu 2-4 g/L datorită fibrinogenului.

Hiperproteinemia este asociată cu: deshidratare (vomă severă, acidoză diabetică, aport redus de apă, diaree, boala Addison) sau în urma a creșterii concentrațiilor unor proteine specifice (Ig în infecții cronice, afecțiuni ale măduvei spinării).

Hipoproteinemia poate apărea ca rezultat al hemodiluției (retenție salină, perfuzii intravenoase masive), sinteză deficitară de proteine, malabsorbție, pierderi excesive ale proteinelor (afecțiuni cronice ale ficatului, arsuri severe).

Determinarea factorului reumatoid (RF) folosind spectrofotometrul BioSystems BTS-350

Aspecte generale

Factorii reumatoizi (FR) reprezintă un grup heterogen de anticorpi, de obicei IgM dar pot fi și de tip IgG sau Ig A. O valoare ridicată a FR ridică o suspiciune de artitră reumatoidă. Prezența sa în ser poate fi detectată cu mulți ani înainte de debutul bolii. Parametrul nu este specific artritei reumatoidide, acesta apărând și în alte boli inflamatorii.

Principiul metodei

Metoda are la bază aglutinarea particulelor de latex acoperite cu gama-globulina umană, gradul de aglutinare fiind proporțional cu concentrația RF și putând fi dozat turbidimetric.

Aparatură și reactivi

- Ser recoltat prin proceduri standard;
- Reactiv A: Tampon Tris 20 mmol/L, azidă de sodiu 0,96 g/L, pH 8,2
- Reactiv B: o suspensie de particule de latex acoperite cu gama-globulină umană, azidă de sodiu 0,95 g/L
- Standard RF: ser uman, se reconstituie cu 3 mL apă distilată
- Soluție salină 9 g/L
- Ser control Rheumatoid nivel I (normal)
- Ser control Rheumatoid nivel II (patologic)
- Spectrofotometru BioSystems BTS-350
- Baie de apă termostatabilă la 37°C
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru (cf. Prospect - Rheumatoid factors, Biosistems, 2022)

A.Pregătirea soluțiilor pentru trasarea curbei de calibrare: se pregătesc diluții ale soluției de standard RF folosind soluție salină 9 g/L ca diluant, conform Tabelului 4.24.

Tabelul 4.24. Compoziția soluțiilor folosite la trasarea curbei de calibrare

	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5
Soluție standard RF (μL)	30	60	120	180	240
Soluție salină (μL)	210	180	120	60	-
Factor de diluție	0,125	0,25	0,5	0,75	1,0

B. Analiza standardelor și a probei de analizat: se pregătesc soluțiile din Tabelul 4.25.

Tabelul 4.25. Compoziția soluțiilor pentru analiza Factorilor reumatoizi

	Standard 1	Standard 2	Standard 3	Standard 4	Standard 5	Blank	Proba de analizat
Standard 1	10 μL	-	-	-	-	-	-
Standard 2	-	10 μL	-	-	-	-	-
Standard 3	-	-	10 μL	-	-	-	-
Standard 4	-	-	-	10 μL	-	-	-
Standard 5	-	-	-	-	10 μL	-	-
Blank	-	-	-	-	-	10 μL	-
Proba de analizat	-	-	-	-	-	-	10 μL
Reactiv A	0,8 mL	0,8 mL	0,8 mL	0,8 mL	0,8 mL	0,8 mL	0,8 mL
Reactiv B	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL	0,2 mL
Omogenizare și introducere eprubeta în spectrofotometru							
După 2 minute de la adăugarea reactivului B se citește absorbanta la 650 nm	$A_{\text{Standard1}}$	$A_{\text{Standard2}}$	$A_{\text{Standard3}}$	$A_{\text{Standard4}}$	$A_{\text{Standard5}}$	A_{Blank}	$A_{\text{Probă}}$
Se calculează diferențele de absorbante	$A_{\text{Standard1}} - A_{\text{Blank}}$	$A_{\text{Standard2}} - A_{\text{Blank}}$	$A_{\text{Standard3}} - A_{\text{Blank}}$	$A_{\text{Standard4}} - A_{\text{Blank}}$	$A_{\text{Standard5}} - A_{\text{Blank}}$	-	$A_{\text{Probă}} - A_{\text{Blank}}$

C. Utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350:

C.1. Introducerea/Verificarea metodei de analiză -introduce/ verifică parametrii specifici analizării analitului: concentrațiile standardelor, blank, controlul, liniaritatea metodei, numărul de replici, unitatea de măsură, lungimea de undă folosită la citire, etc.

C.2. Măsurarea concentrației analitului investigat în probe citește absorbanțele probelor și standardului în raport cu blank-ul și afișarea rezultatului.

În Anexa 3.1. se exemplifică utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350 la analiza acidului uric urinar. Pentru dozarea factorilor reumatoizi se parcurg aceiași pași, alegând din meniurile *Programare* și *Concentrații* metoda pentru Factor reumatoid.

D. Trasarea curbei de calibrare

- Se calculează diferența absorbanțelor $A_{\text{Standard}} - A_{\text{Blank}}$ pentru fiecare standard
- Se reprezintă grafic valorile obținute în funcție de concentrația RF în standarde

Calculul rezultatelor

Cunoscând valoarea $A_{\text{Probă}} - A_{\text{Blank}}$, se extrage de pe curba de calibrare concentrația Rf corespunzătoare diferenței.

Valori de referință orientative pentru Factor reumatoid

- Adulți: max. 30 IU/mL

Observații

- RF este prezent în special în serul pacienților cu artrită reumatoidă, procese inflamatorii cronice, boli infecțioase (endocardita bacteriană, malaria, sifilisul, tuberculoza), boli autoimune (lupus eritematos sistemic, etc.), tuberculoză, hepatita B.

Dozarea creatininei serice - Metoda Folin

Aspecte generale

Creatinina (anhidrida acidului metilguanidilacetic) se produce în mușchi din creatină și creatină fosforilată în urma unui proces de deshidratare nonenzimatică. Creatina este sintetizată la nivelul ficatului și consumată în cea mai mare parte în mușchi unde suferă procese de fosforilare transformându-se în creatină fosforilată. Este evident că viteza de formare a creatininei va fi proporțională cu cantitatea de creatină – creatină fosforilată existentă în mușchi. O altă sursă de creatină o reprezintă o dietă bogată în carne sau suplimentele alimentare, conversia acesteia în creatinină fiind favorizată de temperatura ridicată și un pH-scăzut. În absența unui aport exogen de creatinină, nivelul seric al creatininei în condiții fiziologice are mici variații și din acest motiv este considerat un indicator al filtrării glomerulare. Dozarea creatininei serice se recomandă pacienților

cu hipertensiune, boli renale acute și cronice, manifestări urinare, transpirații profunde, boli extrarenale cu diaree, vărsături, boli acute, sarcina, boli cu metabolism proteic crescut (mielom multiplu, acromegalie), postoperator sau la pacienți care necesită îngrijiri medicale intensive, șoc, politraumatisme, hemodializă, în sepsis, în boli metabolice (diabet zaharat, hiperuricemie), tratament cu medicamente nefrotoxice (Richard și Pincus, 2016; Laborator Synevo (j), 2015; Laboratory Corporation of America, 2010, Albu, 2001, Fischbach (d), 2009).

Principiul lucrării

Metoda se bazează pe reacția în mediu alcalin dintre creatinină și acidul picric cu formarea unui compus de culoare portocalie – roșu aprins, intensitatea culorii fiind direct proporțională cu concentrația creatininei din probă.

Aparatură și reactivi

- Ser sanguin: se recoltează sânge venos *à jeun* în vacutainer fără anticoagulant cu/fără gel separator și se separă serul prin centrifugare; Se respinge specimenul hemolizat, recoltat de pe cateter utilizat pentru perfuzie de soluții nutritive

- Soluție de wolframat de sodiu 10%

- Soluție de H₂SO₄ 2/3N

- Soluție saturată de acid picric

- Soluție de NaOH 10%

- Soluție de picrat alcalin; se obține înainte de utilizare prin omogenizarea 1 volum de soluție de acid picric cu 2 volume soluție NaOH 10%

- Soluție stoc de creatinină: 100 mg creatinină pură sau 160,2 mg clorură de zinc se dizolvă în HCl 0,1N și se aduce la semn la 100 mL cu HCl 0,1N

- Soluția standard de creatinină: se diluează 1 mL din soluția stoc de creatinină la 100 mL cu apă distilată. Soluția conținând 0,01 mg creatinină/mL

- Spectrometru UV-VIS

- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

Se prepară proba de analizat, blank-ul și standard-ul conform Tabelului 4.26.

Tabelul 4.26. Compoziția soluțiilor pentru dozarea creatininei serice

Reactivi	Proba de analizat	Blank	Standard
Ser, mL	2	-	-
Soluție de picrat alcalin	-	6	-
Apă bidistilată, mL	-	2	-
Acid picric saturat, mL	6	-	6
Standard de creatinină, mL	-	-	2
Se păstrează 15 – 20 s în baie de apă fierbinte și apoi se răcesc			
Filtrat, mL	5	5	5
Soluție NaOH, mL	0,25	-	0,25
Omogenizare, repaos 15 minute			
Absorbanța la 530 nm în raport cu blank-ul	Ap	-	As

Calcul rezultatelor

$$\text{Creatinină (mg creatinină/100 mL ser)} = \text{Ap/As} \quad (4.24)$$

Dozarea bilirubinei serice totale și directe (bilirubinemia)**Aspecte generale**

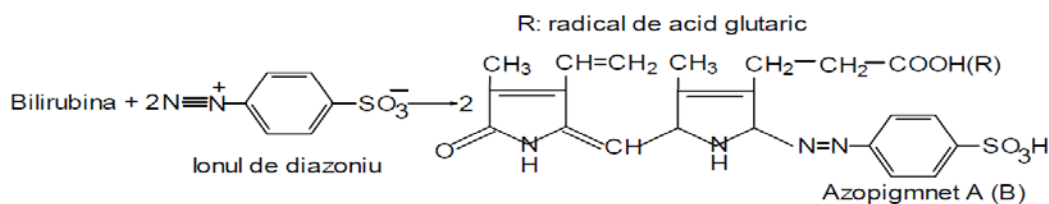
Bilirubina este un compus galben-marونیu din bila secretată de către hepatocit, se acumulează în vezica biliară și deversată în duoden pentru digestie. Se elimină prin scaun, dându-i culoarea maronie specifică. În sânge, bilirubina există în două forme: (i) *Bilirubina indirectă (neconjugată)* care este insolubilă în apă iar în ficat se transformă în forma solubilă (directă sau conjugată); (ii) *Bilirubina directă (conjugată)* care este solubilă în apă și provine din forma neconjugată (Laborator Synevo (k), 2010; Albu, 2001, Fischbach (b), 2009).

În laborator se masoară fracțiunea hidrosolubilă conjugată care reacționează direct cu reactivul diazo și fracțiunea liposolubilă (bilirubina neconjugată). Bilirubina totală va fi dată de suma celor două fracțiuni.

Dozarea bilirubinei serice - Diazoreacția van den Bergh**Principiul lucrării**

Metoda are la bază reacția dintre bilirubina și *diazo-reactivul Ehrlich* (acid sulfanilic diazotat) cu formare în mediu slab acid sau neutru de azopigmenți (culoare roșie) (reacția van den Bergh). Azopigmentul A este alcătuit dintr-un fragment de bilirubină cuplată cu sarea de diazoniu a acidului sulfanilic; azopigmentul B este alcătuit dintr-un fragment de bilirubină conjugată cuplată

cu aceeași sare de diazoniu. Intensitatea colorației roșii este direct proporțională cu concentrația bilirubinei din ser.



Bilirubina neconjugată este insolubilă în apă dar este menținută în soluție apoasă ca urmare a legării ei puternice pe albumină. În această formă, bilirubina nu reacționează direct cu reactivul diazo ci doar dacă sunt prezenți acceleratori (alcooli inferiori, cofeină, etc.) care o desfac din legătura cu albumina și o mențin în soluție. Deoarece această formă a bilirubinei nu este filtrată la nivel glomerular, în mod normal nu apare în urină.

Bilirubina conjugată (bilirubina directă) este hidrosolubilă și reacționează în mod direct cu reactivul diazo. Apare în urină în mod normal deoarece se filtrează la nivel glomerular.

Metoda de analiză dozează în paralel bilirubina totală (directă + indirectă) și bilirubina directă, iar bilirubina îndirectă se obține prin diferență între bilirubina totală și bilirubina directă.

Aparatură și reactivi

- Ser sanguin: se separă serul imediat și se lucrează în max. 4 ore; pe durata așteptării serul trebuie protejat de lumină (lumina produce scăderi semnificative după 2-3 ore). În cazul nou-născuților, sângele se va preleva de la nivelul călcâiului. Se respinge specimen hemolizat, specimen neprotejat de lumină

- Soluție de HCl 1N

- Soluție de cofeină-benzoat-acetat: 20 g cofeină pură se amestecă cu 30 g benzoat de sodiu, 50 g acetat de sodiu, se adaugă 400 mL apă distilată, se omogenizează, se încălzește soluția ușor și după răcire se filtrează

- Reactiv diazo: Soluția A: 0,5 g acid sulfanilic se amestecă cu 125 mL HCl 1N și se aduce la volum de 500 mL cu apă distilată; Soluția B: soluție de NaNO₂ 0,5%. Înainte de folosire se amestecă 10 mL soluție A cu 0,3 mL soluție B

- Soluție de NaCl 0,9%

- Spectrometru UV-VIS

- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

Se prepară probele conform Tabelului 4.27.

Tabelul 4.27. Compoziția soluțiilor pentru dozarea bilirubinei serice

Reactivi	Bilirubină totală	Bilirubină directă	Blank
Reactiv Ehrlich, mL	0,5	0,5	-
Soluție cofeină, mL	3,5	-	-
Soluție NaCl, mL	-	3,5	4
Ser, mL	1	1	1
Omogenizare, repaos 5 minute			
Absorbanta la 530 nm în raport cu blank-ul	At	Ad	-

Calcul rezultatelor

$$\text{Bilirubină totală (mg bilirubină/100 mL ser)} = \frac{A_t}{A_{1\text{mg}\%}} \cdot 5 = A_t \cdot 5,3 \quad (4.24)$$

$$\text{Bilirubină directă (mg bilirubină/100 mL ser)} = \frac{A_d}{A_{1\text{mg}\%}} \cdot 5 = A_d \cdot 5,3 \quad (4.25)$$

$$\text{Bilirubină } (\mu\text{mol/L}) = \text{mg/dL} \times 17.1 = \mu\text{mol/L} \quad (4.26)$$

unde:

$A_{1\text{mg}\%}$ - coeficientul de absorbanță al azopigmentului la 530 nm (cuva de 1 cm) = 0,943

5 - diluția probei: Volum final probă = 5 mL, volum probă = 1 mL, diluția = 5/1 = 5

Dozarea bilirubinei totale și directe folosind spectrofotometrul BioSystems BTS-350

Principiul metodei

Metoda are la bază diazotarea bilirubinei cu acid sulfanilic în prezența cetrimidei (bromură de alchiltrimetilammonium) cu formarea unui complex colorat în albastru a cărui intensitate, proporțională cu concentrația bilirubinei, poate fi citită spectrofotometric (Metoda Malloy-Evelyn).

Aparatură și reactivi

- Ser recoltat prin proceduri standard;
- *Reactivi pentru Bilirubină totală*
 - Reactiv AT: Soluție acid sulfanilic 29 mmol/L, HCl 0,2 mol/L, cetrimide 50 mmol/L
 - Reactiv BT: Soluție de nitrit de sodiu 11,6 mmol/L

- Reactiv de lucru pentru Bilirubină totală: se transferă reactivul din falconul BT în flaconul cu reactiv AT; pentru volume mai mici se amestecă 1 mL reactiv BT + 5 mL reactiv AT

- *Reactivi pentru bilirubină directă*

- Reactiv AD: Acid sulfanilic 35 mmol/L, HCl 0,24 mol/L

- Reactiv BD: Nitrit de sodiu 3,5 mmol/L

- Reactiv de lucru pentru Bilirubină directă: se transferă reactivul din flaconul BD în flaconul cu reactiv AD; pentru volume mai mici se amestecă 1 mL Reactiv BD + 4 ml Reactiv AD

- Standard bilirubină reconstituit cu 5,0 mL apă distilată

- Ser de control pentru biochimie nivel I (normal)

- Ser control pentru biochimie nivel II (patologic)

- Spectrofotometru BioSystems BTS-350

- Baie de apă

- Centrifugă

- Sticlărie de laborator

Mod de lucru (cf. Prospect – Bilirubină (totală și directă), BioSystems, 2022)

A. Pregătirea probelor pentru analiza bilirubinei totale: se pregătesc soluțiile conform Tabelului 4.28.

Tabelul 4.28. Compoziția soluțiilor pentru dozarea bilirubinei totale

Reactiv	Eprubeta							
	1 Blank reactive	2 Blank probă	3 Blank control I	4 Blank control II	5 Probă	6 Control I	7 Control II	8 Standard
Apă distilată	100 μL	-	-	-	-	-	-	-
Probă	-	100 μL	-	-	100 μL	-	-	-
Control normal (nivel I)	-	-	100 μL	-	-	100 μL	-	-
Control patologic (nivel II)	-	-	-	100 μL	-	-	100 μL	-
Standard	-	-	-	-	-	-	-	100 μL
Reactiv AT	-	100 μL	100 μL	100 μL	-	-	-	-
Reactiv de lucru pentru bilitubină totală	1 mL	-	-	-	1 mL	1 mL	1 mL	1 mL
Omogenizare energetică și repaos 2 minute la temperatura camerei								

Se citește absorbanta blank-urilor la 540 nm față de apa distilată	A _{Br}	A _{Bp}	A _{BcI}	A _{BcII}	-	-	-	-
Se citește absorbanta probelor și standardului la 540 nm față de blank reactiv	-	-	-	-	A _p	A _{cI}	A _{cII}	A _s

B. Pregătirea probelor pentru analiza bilirubinei directe: se pregătesc soluțiile conform Tabelului 4.29.

Tabelul 4.29. Compoziția soluțiilor pentru dozarea bilirubinei directe

Reactiv	Eprubeta 1	Eprubeta 2	Eprubeta 3	Eprubeta 4	Eprubeta 5	Eprubeta 6	Eprubeta 7
	Blank reactiv	Blank probă	Blank control I	Blank control II	Probă	Control I	Control II
Apă distilată	100 μL	-	-	-	-	-	-
Probă	-	100 μL	-	-	100 μL	-	-
Control normal (nivel I)	-	-	100 μL	-	-	100 μL	-
Control patologic (nivel II)	-	-	-	100 μL	-	-	100 μL
Reactiv AD	-	100 μL	100 μL	100 μL	-	-	-
Reactiv de lucru pentru bilitubină directă	1 mL	-	-	-	1 mL	1 mL	1 mL
Omogenizare energetică și repaos exact 5 minute la 37°C							
Se citește absorbanta blank-urilor probelor la 540 nm față de apa distilată	-	A _{Bp}	A _{BcI}	A _{BcII}	-	-	-
Se citește	-	-	-	-	A _p	A _{cI}	A _{cII}

absorbanță probelor la 540 nm față de Blank reactiv							
--	--	--	--	--	--	--	--

C. Utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350:

C.1. Introducerea/Verificarea metodei de analiză -introduce/ verifică parametrii specifici analizării analitului: concentrațiile standardelor, blank, controlul, liniaritatea metodei, numărul de replici, unitatea de măsură, lungimea de undă folosită la citire, etc.

C.2. Măsurarea concentrației analitului investigat în probe citește absorbanțele probelor și standardului în raport cu blank-ul și afișează rezultatul.

În Anexa 3.1. se exemplifică utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350 la analiza acidului uric urinar. Pentru dozarea bilirubinei, se parcurg aceiași pași, alegând din meniurile *Programare* și *Concentrații* metoda pentru Bilirubină totală și directă.

Calculul rezultatelor

Concentrația bilirubinei se calculează cu relația:

$$\text{Bilirubină (mg/dL)} = \frac{A_P - A_{BP}}{A_S} * \text{Conc_standard} \quad (4.27)$$

Valori de referință orientative pentru bilirubină

- Adulți

Totală	Max. 2.0 mg/dL = 34 μmol/L
Directă	Max 0.3 mg/dL = 5 μmol/L

- Nou născuți

	Prematuri	Născuți la termen
În primele 24 ore	1.0 - 8.0 mg/dl = 17- 137 μmol/L	2.0 - 6.0 mg/dL = 34-103 μmol/L
În primele 48 ore	6.0 - 12.0 mg/dl = 103-205 μmol/L	6.0 - 10.0 mg/dL = 103-171 μmol/L
3-5 zile	10 - 14 mg/dl = 171-239 μmol/L	4.0 - 8.0 mg/dL = 68- 37 μmol/L

Observații

- Hiperbilirubinemia cu bilirubina neconjugata (directă) este asociată anemiilor hemolitice, sindromului Gilbert, cirozei hepatice.

- Hiperbilirubinemia cu bilirubina conjugată (indirectă) este asociată sindromului Dubin-Johnson, hepatitei, hepatopatiei alcoolice, toxicității unor medicamente, prezenței unui calcul biliar

Dozarea proteinei-C reactive folosind spectrofotometrul BioSystems BTS-350

Aspecte generale

Proteina C reactivă este sintetizată în ficat de către macrofage și adipocite ca răspuns la o inflamație.

Principiul metodei

Metoda de analiză se bazează pe aglutinarea pe care o produce proteina C reactivă (CRP) asupra particulelor de latex acoperite cu anticorpi anti-proteină C reactivă umană. Gradul de aglutinare a particulelor este proporțional cu concentrația CRP și poate fi dozată turbidimetric.

Aparatură și reactivi

- Ser recoltat prin proceduri standard
- Reactiv A: Tampon glicină 0,1 mol/L, azidă de sodiu 0,96 g/L, pH 8,6
- Reactiv B: O suspensie de particule de latex acoperite cu anticorpi anti CRP umană, azidă de sodiu 0,96 g/L
- Standard CRP reconstituit cu 1 mL apă distilată
- Reactiv de lucru: se adaugă conținutul flaconului cu reactiv B în flaconul cu reactiv A; volume mai mici se pot prepara prin amestecarea a 1 mL reactiv B + 5 mL reactiv A; înainte de pipetare, flaconul se agită
- Ser de control pentru proteine nivel I (normal)
- Ser control pentru proteine nivel II (patologic)
- Spectrofotometru BioSystems BTS-350
- Baie de apă
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru (cf. Prospect – C-Reactive protein, BioSystems, 2022)

A. Pregătirea probelor pentru analiza proteinei C reactive: se pregătesc soluțiile conform Tabelului 4.30.

Tabelul 4.30. Prepararea soluțiilor folosite la dozarea proteinei C reactive

Reactiv	Standard	Control I	Control II	Proba
Standard	7 μL	-	-	-
Control I	-	7 μL	-	-
Control II	-	-	7 μL	-
Reactiv de lucru	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Se omogenizează și se introduce imediat în spectrofotometru				
Se citește absorbanta la 540 nm după 10 secunde (A ₁₀) și după 20 de secunde (A ₂₀)	A _{S10} A _{S20}	A _{CI10} A _{CI20}	A _{CII10} A _{CII20}	A _{P10} A _{P20}

B. Utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350:

B.1. Introducerea/Verificarea metodei de analiză -introduce/ verifică parametrii specifici analizării analitului: concentrațiile standardelor, blank, controlul, liniaritatea metodei, numărul de replici, unitatea de măsură, lungimea de undă folosită la citire, etc.

B.2. Măsurarea concentrației analitului investigat în probe citește absorbanțele probelor și standardului în raport cu blank-ul și afișează rezultatul.

În Anexa 3.1. se exemplifică utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350 la analiza acidului uric urinar. Pentru dozarea proteinei C reactive, se parcurg aceiași pași, alegând din meniurile *Programare* și *Concentrații* metoda pentru Proteină C reactivă.

Calculul rezultatelor

Concentrația proteinei C reactive în probă este calculată cu relația:

$$\text{Proteină C reactivă (mg/L)} = \frac{A_{P20} - A_{P10}}{A_{S20} - A_{S10}} * \text{Conc_standard} \quad (4.28)$$

Valori de referință orientative pentru proteina C reactivă

- Adulți: max. 5 mg/L

Observații

- În condiții normale de sănătate, concentrația proteinei C reactive în sânge este scăzută
 - Valorile ridicate ale concentrației proteinei C reactive cresc semnificativ după infarctul miocardic, intervenții chirurgicale, afecțiuni care implică distrugerii tisulare.

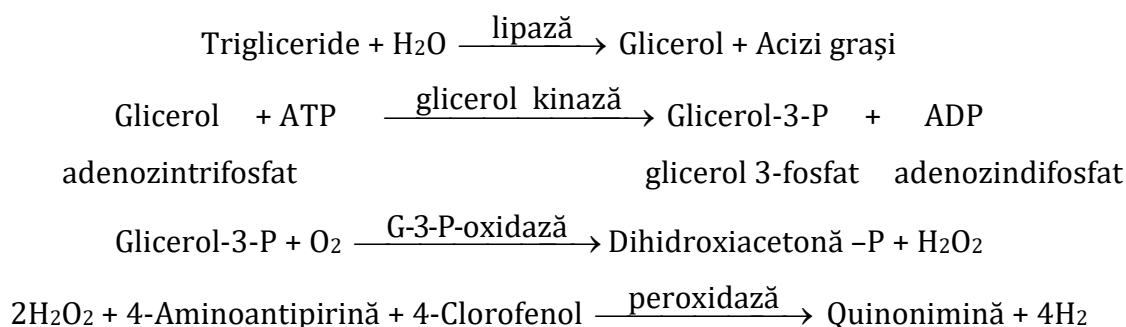
Dozarea trigliceridelor folosind spectrofotometrul BioSystems BTS-350

Aspecte generale

Trigliceridele sunt esteri ai glicerinei (glicerol) cu acizi grași, cu rol principal asigurarea energiei celulelor din organism. Trigliceridele provin parțial din alimentație, iar o altă parte este sintetizată în ficat.

Principiul metodei

Metoda de analiză constă în includerea trigliceridelor într-un șir de reacții enzimatiche cu formarea produsului quinonimină (compus roșu). Intensitatea acestuia, care se poate citi spectrofotometric, este direct proporțională cu concentrația trigliceridelor în probă:



Aparatură și reactivi

- Ser recoltat prin proceduri standard
- Reactiv A: Pipes (piperazine-N,N'-bis(2-ethanesulfonic acid) 45 mmol/L, acetat de magneziu 5 mmol/L, 4-clorofenol 6 mmol/L, lipază > 100 U/mL, glicerol kinază : 1,5 U/mL, glicerol-3-fosfat oxidază : 4 U/mL, peroxidază : 0,8 U/mL, 4-aminoantipirină 0,75 mmol/L, ATP 0,9 mmol/L, pH 7.0
- Standard trigliceride: glicerol echivalent la 200 mg/dL (2.26 mmol/dL) trioleină; Standard apos primar
- Ser de control biochimie nivel I (normal)
- Ser de control biochimie nivel II (patologic)
- Spectrofotometru BioSystems BTS-350
- Baie de apă
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru (cf. Prospect – Triglycerides, BioSystems, 2022)

A. Pregătirea probelor pentru analiza trigliceridelor: se pregătesc soluțiile conform Tabelului 4.30 (Figura 4.6):

Tabelul 4.30. Pregătirea soluțiilor folosite la dozarea trigliceridelor

Reactiv	Blank	Standard	Ser control biochimic nivel I	Ser control biochimic nivel II	Proba
Standard trigliceride	-	10 μ L	-	-	-
Probă	-	-	-	-	10 μ L
Ser control biochimic nivel I	-	-	10 μ L	-	-
Ser control biochimic nivel II	-	-	-	10 μ L	-
Reactiv A	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Omogenizare, incubare 15 minute la 16 – 25°C sau 5 minute la 37°C					
Se citește absorbanta probelor și standardului la 500 nm	-	As	AcI	AcII	Ap

**Figura 4.6.** Dozarea trigliceridelor

B – blank, S – standard, P - probe

B. Utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350:

B.1. Introducerea/Verificarea metodei de analiză -introduce/ verifică parametrii specifici analizării analitului: concentrațiile standardelor, blank, controlul, liniaritatea metodei, numărul de replici, unitatea de măsură, lungimea de undă folosită la citire, etc.

B.2. Măsurarea concentrației analitului investigat în probe citește absorbanțele probelor și standardului în raport cu blank-ul și afișează rezultatul.

În Anexa 3.1. se exemplifică utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350 la analiza acidului uric urinar. Pentru dozarea trigliceridelor se parcurg aceiași pași, alegând din meniurile *Programare* și *Concentrații* metoda pentru Trigliceride.

Calculul rezultatelor

Concentrația trigliceridelor se calculează cu relația:

$$\text{Trigliceride (mg/L)} = \frac{A_P}{A_S} * \text{Conc_standard} \quad (4.29)$$

Dacă se folosește standardul pentru trigliceride, valorile vor fi:

$\frac{A_P}{A_S}$	X 200 = mg/dL trigliceride X 2.26 = mmol/L trigliceride
-------------------	--

Valori de referință orientative pentru trigliceride

< 150 mg/dL = 1,7 mmol/L	Normal
150 – 199 mg/dL = 1,70 – 2,25 mmol/L	Limită superioară
200 – 499 mg/dL = 2,26 – 5,64 mmol/L	Ridicat
> 500 md/dL = : 5.65 mmol/L	Foarte ridicat

Observații

- Valori mari ale trigliceridelor sunt specifice afecțiunilor ficatului, diabetului, hipotiroidismului, alcoolismului, etc.

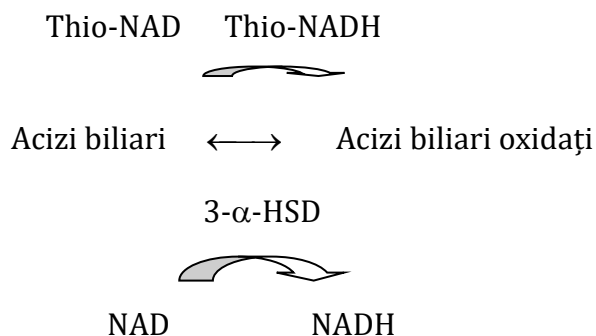
Dozarea acizilor biliari totali folosind spectrofotometrul BioSystems BTS-350

Aspecte generale

Acizii biliari se clasifică în două categorii: (i) Acizii biliari primari (acidul chinooxicolic și acidul colic) sunt produși de către ficat; (ii) Acizii biliari secundari (dezoxicolatul și litocolatul) rezultă în urma acțiunii bacteriene din colon asupra acizilor biliari primari. Acizii biliari primari, componenți majoritari în compoziția bilei, sunt steroizi care se produc în ficat prin conjugarea colesterolului cu taurină și glicină, depozitați în vezica biliară și ajung în intestinul subțire prin intermediul bilei. Aceștia au rolul de a facilita acțiunea lipazei pancreatice asupra grăsimilor din dieta alimentară, și absorbția vitaminelor liposolubile. În timpul absorbției, o mare parte a acizilor biliari (90% -95%) sunt resorbiți pasiv de-a lungul intestinului (ileon), se reintroduc în circulația sanguină portală și după reconjungere, sunt secretați din nou în bilă. Acizii biliari neabsorbiți (5%) sunt eliminați prin fecale. Pierderea de acizi biliari în fecale este compensată prin producție de colesterol de către ficat. Afectarea circulației enterohepatice conduce la creșterea nivelului acizilor biliari în sânge, și din acest motiv nivelul acizilor biliari în ser sau plasmă este considerat un indicator sensibil al funcționării ficatului.

Principiul metodei

Metoda are la bază oxidarea acizilor biliari sub acțiunea enzimei 3- α -hidroxisteroid dehidrogenazei (3- α -HSD) în prezență de thio-NAD (Thio-Nicotinamidă-Adenină Dinucleotide) până la 3-keto-steroidi și thio-NADH. Reacția este reversibilă și 3- α -HSD poate converti produșii de reacție (3-keto-steroidi și thio-NADH) la reactanții inițiali (acizi biliari și thio-NAD). În prezența excasului de NADH, ciclul enzimatic decurge eficient și viteza de formare a thio-NADH se determină prin măsurarea modificarea specifică a absorbantei la lungimea de undă 405 nm.



Aparatură și reactivi

- Ser sau plasma recoltate prin proceduri standard
- Reactiv A: Thio-NAD 0,9 g/L, NaCl 50 mmol/L, agenți de conservare
- Reactiv B: agenți tampon Good
- Standard de acizi biliari: cholat de sodium, standard apos primar
- Ser de control biochimie nivel I (normal)
- Ser de control biochimie nivel II (patologic)
- Spectrofotometru BioSystems BTS-350
- Baie de apă
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru (cf. Prospect – Total Bile acids, BioSystems, 2022)

A. Pregătirea probelor pentru analiza acizilor biliari totali: se pregătesc soluțiile conform Tabelului 4.31.

Tabelul 4.31. Compoziția soluțiilor folosite pentru dozarea acizilor biliari totali

Reactiv	Standard	Ser control biochimic nivel I	Ser control biochimic nivel II	Proba
Standard acizi biliari	12 μL	-	-	-
Probă	-	-	-	12 μL
Ser control biochimic nivel I	-	12 μL	-	-
Ser control biochimic nivel II	-	-	12 μL	-
Reactiv A	900 μL	900 μL	900 μL	900 μL
Omogenizare, incubare 5 minute la 37°C				
Reactiv B	300 μL	300 μL	300 μL	300 μL
Se citește absorbanta probelor și standardului la 405 nm după 60 s de la introducerea în cuvetă	A _{S1}	A _{C11}	A _{C111}	A _{P1}
Se citește absorbanta probelor și standardului la 405 nm după 180 s de la introducerea în cuvetă	A _{S2}	A _{C12}	A _{C112}	A _{P2}

B. Utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350:

B.1. Introducerea/Verificarea metodei de analiză -introduce/ verifică parametrii specifici analizării analitului: concentrațiile standardelor, blank, controlul, liniaritatea metodei, numărul de replici, unitatea de măsură, lungimea de undă folosită la citire, etc.

B.2. Măsurarea concentrației analitului investigat în probe citește absorbanțele probelor și standardului în raport cu blank-ul și afișează rezultatul.

În Anexa 3.1. se exemplifică utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350 la analiza acidului uric urinar. Pentru dozarea acizilor biliari totali, se parcurg aceiași pași, alegând din meniurile *Programare* și *Concentrații* metoda pentru Acizi biliari totali

Calculul rezultatelor

Concentrația acizilor biliari totali afișată pe ecran este calculată cu relația:

$$\text{Acizi biliari totali } (\mu\text{mol/L}) = \frac{(A_{P2} - A_{P1})}{(A_{S1} - A_{S1})} \times C_{\text{standard}} \quad (4.30)$$

Dacă se folosește standardul pentru acizi biliari totali, calculul va fi:

$\frac{(A_{P2} - A_{P1})}{(A_{S1} - A_{S1})}$	* 50 = Acizi biliari totali (μmol/L)
---	--------------------------------------

Valori de referință orientative pentru acizi biliari totali

Ser sau plasmă	< 10 $\mu\text{mol/L}$
----------------	------------------------

Observații

- Valori ridicate ale acizilor biliari totali în ser sunt asociate hepatitelor acute, hepatite cronice, cancere hepatice.

**Determinarea capacității totale de legare a fierului folosind
spectrofotometrul BioSystems BTS-350****Aspecte generale**

Capacitatea totală de legare a fierului este un parametru care exprimă cantitatea totală de fier pe care o pot lega proteinele plasmatice. Toată capacitatea de fixare se datorează transferinei.

Principiul metodei

Metoda are la bază adăugarea în proba de analizat a unui exces de Fe^{3+} pentru a satura transferina serică. Fe^{3+} rămas necomplexat este precipitat cu carbonat bazic de magneziu, iar fierul complexat de proteine din supernatant este dozat spectrofotometric.

Aparatură și reactivi

- Ser sau plasmă heparinizată recoltate prin proceduri standard
- Reactivi pentru saturarea transferinei serice și precipitarea excesului de Fe^{3+}
- Reactiv A: FeCl_3 0,12 mmol/L
- Reactiv B: carbonat bazic de magneziu pulbere
- Reactiv pentru dozarea fierului
 - Reactiv A: Clorură de guanidinium 1,0 mol/L, hidroxilamină 0,3 mol/L, tampon acetat 0,3 mol/L, pH 4,0
 - Reactiv B: Ferozină 8 mmol/L
 - Reactiv de lucru: se transferă conținutul flaconului cu reactiv B în recipientul cu reactiv A, se omogenizează; pentru volume mai mici se pot folosește proporțiile: 1 mL reactiv B + 4 mL reactiv A
 - Fe standard: Fier 200 $\mu\text{g/dL}$ (35,8 $\mu\text{mol/L}$), standard prima lichid
- Ser de control biochimie nivel I (normal)

- Ser de control biochimie nivel II (patologic)
- Spectrofotometru BioSystems BTS-350
- Centrifugă
- Baie de apă
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru (cf. Prospect – Total iron binding capacity, BioSystems, 2022)

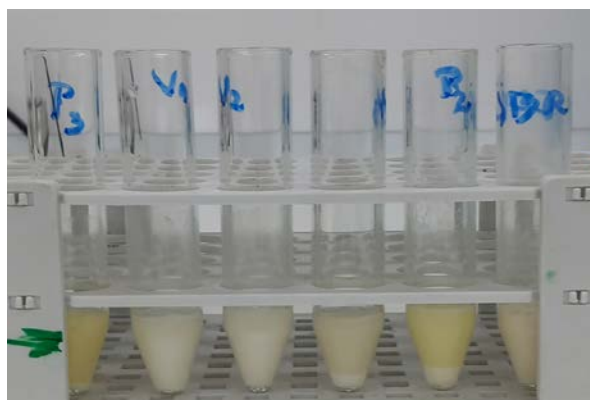
A. Pregătirea probelor pentru separarea fierului: se pregătesc soluțiile conform Tabelului 4.32 (Figura 4.7).

Tabelul 4.32. Pregătirea soluțiilor folosite la determinarea capacității totale de legare a fierului

Reactiv	Probă	Reactiv A
Probă	0,5 mL	-
Reactiv A	-	1,0 mL
Omogenizare, incubare 5-30 minute la temperatura camerei (16 – 25°C)		
Reactiv B	1 lingură	1 lingură
Omogenizare, incubare 30-60 minute la 16 – 25°C; se agită periodic pentru omogenizare		
Centrifugare la minim 3000 rot/min timp de 10 minute		
Recoltare supernatant		
Analiza Fe în supernatant cf. Tabel 4.33		



a. Adăugare de FeCl_3 în exces pentru saturarea transferinei serice



b. Adăugarea $\text{Mg}(\text{OH})_2$ și MgCO_3 pentru precipitarea excesului de Fe^{3+}



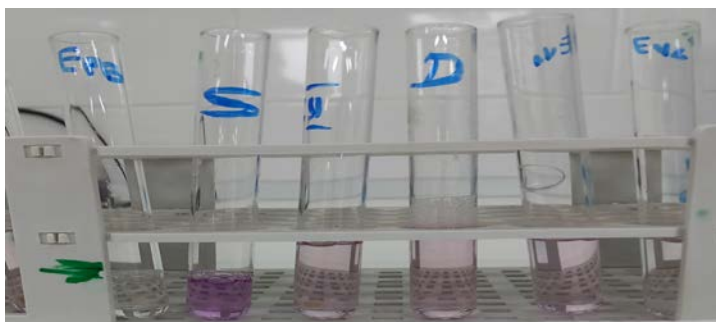
c. centrifugarea probelor și separarea supernatantului

Figura 4.7. Separarea fierului în supernatant

B. Pregătirea probelor pentru măsurarea concentrației fierului în supernatant: se pregătesc soluțiile conform Tabelului 4.33.

Tabelul 4.33. Compoziția soluțiilor folosite pentru determinarea concentrației fierului în supernatant

	Blank reactiv	Blank probă	Control I		Control II	Probă (supernatant)	Standard
Apă distilată	200 μ L	-	-		-	-	
Control I	-	-	200 μ L		-	-	-
Control II		-	-		200 μ L	-	-
Standard	-	-	-		-	-	200 μ L
Probă (supernatant)	-	200 μ L	-		-	200 μ L	-
Reactiv A	-	1,0 mL	-		-	-	-
Reactiv de lucru	1,0 mL	-	1,0 mL		1,0 mL	1,0 mL	1,0 mL
Omogenizare și incubare la temperatura camerei timp de 5 minute							
Se citește absorbanta blankului de reactiv la 560 nm față de apă distilată	ABR	-	-		-	-	-
Se citește absorbanta standardului și probei la 560 nm față de blankul de reactiv	-	ABP	ACI		ACII	AP	AS



d. adăugare de ferozină

B – blank; S – standard; p – probe

Figura 4.7. Dozarea fierului

C. Utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350:

C.1. Introducerea/Verificarea metodei de analiză -introduce/ verifică parametrii specifici analizării analitului: concentrațiile standardelor, blank, controlul, liniaritatea metodei, numărul de replici, unitatea de măsură, lungimea de undă folosită la citire, etc.

C.2. Măsurarea concentrației analitului investigat în probe citește absorbanțele probelor și standardului în raport cu blank-ul și afișează rezultatul.

În Anexa 3.1. se exemplifică utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350 la analiza acidului uric urinar. Pentru dozarea capacității totale de legare a fierului, se parcurg aceiași pași, alegând din meniurile *Programare* și *Concentrații* metoda pentru Capacitate totală de legare a fierului.

Calculul rezultatelor

Concentrația fierului în proba de analizat se calculează cu relația:

$$\text{Concentrație fier } (\mu\text{g/dL}) = \frac{A_P - A_{BP}}{A_S} * \text{Conc_standard} \quad (4.31)$$

Valori de referință orientative pentru concentrația de fier în ser și plasmă

Bărbați	70 – 180 $\mu\text{g/dL}$ = 12,5 – 32,2 $\mu\text{mol/dL}$
Femei	60 – 180 $\mu\text{g/dL}$ = 10,7 – 32,2 $\mu\text{mol/dL}$

Observații

- Concentrații ridicate ale fierului seric se găsesc în hematomacroză, intoxicații acute cu fier, ciroză activă, hepatită acută

- Concentrații scăzute ale fierului seric se întâlnesc în anemie feriprivă, afecțiunii inflamatorii cronice.

Dozarea elementelor minerale din sânge (ionograma)

Aspecte generale

Organismul uman conține o serie de elemente minerale esențiale, nivelul optim al acestora asigurând buna funcționare a organismului. Alimentația săracă în minerale, unele medicamente, anumite afecțiuni sau expunerea la diferiți factori de mediu pot conduce la dezechilibre minerale cu efecte negative asupra funcționării organismului.

Sodiul este un mineral esențial al organismului intervenind, alături de potasiu în menținerea homeostaziei organismului, în menținerea pH-ului sângelui, în realizarea unei suprafețe protectoare a mucoasei gastrice împotriva acțiunii corozive a sucurilor gastrice, în menținerea tonusului muscular, în reglarea echilibrului hidrosalin și implicit în reglarea tensiunii arteriale și menținerea volumului sanguin total (volemia). Aproximativ 30% din totalul de sodiu este depozitat în oase iar restul în fluidele corporale. Din totalul cantității de sodiu existent în fluide, aproximativ 60% apare în fluidele extracelulare iar restul în plasma sanguină.

Potasiul este un cation intracelular extrem de important pentru organism. Fiind cationul principal în fluidul intracelular, K^+ participă la realizarea funcțiilor nervoasă și musculară, păstrează echilibrul hidric (împreună cu Na^+) și a celui acido-bazic, depolarizarea și contracția miocardului în funcționarea Na^+/K^+ -ATP-azei, sinteza proteinelor musculare și contracția musculară, reglează sinteza unor hormoni: insulină, glucagon, hormon de creștere. Potasiul din spațiul intracelular migrează în cel extracelular pe durata contracției musculare, locul lui în celulă fiind luat de sodiu. Excesul de K^+ poate cauza ulcerul intestinului subțire sau scăderea (oprirea) activității cardiace (Albu, 2001). Excesul de K^+ din organism se excretă în urină. În bolile în care excretația acestuia nu este posibilă (boala Addison, insuficiență renală), acesta se acumulează în organism și provoacă tulburări ale ritmului cardiac.

Calciul este mineralul cel mai răspândit în corpul uman, corpul unui adult conținând aproximativ 1,3 Kg de calciu din care 99% apare în schelet sub formă de hidroxiapatită (Richard și Pincus, 2016). Restul de 1% apare în fluidele extracelulare și țesuturile moi. Mai puțin de 1% din conținutul scheletic de Ca apare în fluidul osos aflat într-un schimb continuu cu fluidele extracelulare (Mundy și Guise, 1999). În serul sanguin calciul există în trei forme: (i) *calciul liber* (calciu ionizat) proximativ 50% din total, care este considerat și forma activă; (ii) *calciul legat* (10%) de molecule mici (dializabil): bicarbonat, lactat, fosfat; (iii) *calciul legat proteic* (40%). Pe lângă rolul său de constituire a scheletului, calciul joacă roluri vitale în diverse procese fiziologice din organism: coagularea sângelui, activitatea enzimatică, menținerea tonusului muscular,

biosinteza ADN și ARN, activitatea glandulară, reglarea permeabilității membranelor celulare.

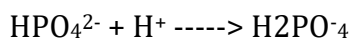
Magneziul este al doilea cation după calciu din punctul de vedere al prevalenței intracelulare. Conținutul total de magneziu în corpul unui adult normal este de 22.66 g din care 50÷60% este în oase iar 40÷50% în țesuturile moi. În serul sanguin Mag apare sub formă ionizată (55%), legat proteic (30%) și complexat (15%) cu diverși anioni (fosfat, bicarbonat, citrat). Magneziul este esențial pentru funcționarea enzimelor, transcripția ADN și ARN, activitatea canalelor de calciu, activitatea cardiacă (Weisinger și Bellorin-Font, 1998).

Fierul: în jur de 75% din conținutul în fier al organismului este conținut în globulele roșii (hematii) din sânge, sub forma hemoglobinei. Acesta este o asociație proteină-fier, responsabilă de transportul fierului de la plămâni spre toate organele corpului. 5% din fierul din organism se găsește în mioglobină, o formă a hemoglobinei care apare în mușchi, cu rol de transport și păstrare a oxigenului pe care îl eliberează pentru utilizare în celulele corpului. De asemenea, fierul apare în compoziția a numeroase enzime, catalizatori care permit desfășurarea reacțiilor biochimice din organism. Carența de fier se numește anemia hipocromică a celulelor microcitice (anemia carenței de fier) se caracterizează prin hematii mai mici decât normal, palide la culoare, ca urmare a conținutului mic de hemoglobină. Aceasta se poate manifesta prin: palpitații în timpul efortului fizic, oboseală, lipsa de atenție, dificultăți la înghițire, irascibilitate, paloare și o stare generală de rău. Fierul este nutrientul cel mai dificil de obținut prin alimentație. Alimentele cu conținut ridicat de fier sunt: carnea de pui și peștele, carnea roșie (ficatul), ouăle, pâinea și cerealele (întegrale sau fortificate cu fier), legumele cu frunze, cartofii și alte legume. La nivelul tractului digestiv biodisponibilitatea fierului din alimente variază foarte mult. Cel mai ușor absorbabil este fierul organic (din carnea roșie), cu o pondere de 10 - 30%. Deoarece plantele conțin fier anorganic, doar doar 2 - 10% care este absorbit de tractul digestiv. Cantități mari de fier se pierd prin prepararea alimentelor. Când se gătesc mâncăruri acide în vase din fier, acesta este dizolvat și intră în alimente, crescându-le considerabil conținutul în fier. Vitamina C crește absorbția fierului din alimentele vegetale, și previne transformarea acestuia în forme instabile cauzatoare de stres oxidativ. Excesul de fier nu este de dorit deoarece poate provoca probleme de sănătate. Acumularea în exces a fierului în organism poate fi cauzată de: hemocromatoza - o boală ereditară, post-hepatite virale sau cauzate de alcoolism, multiple transfuzii de sânge; terapie cu fier excesivă, boli cronice inflamatorii (artrită reumatoidă, malignități leziuni hepatice). Mai mult de 50 % dintre persoane pot avea niveluri ridicate de fier seric după masă, dar acesta este tranzitoriu. Deoarece concentrația fierului seric are variație diurnă se recomandă ca recoltarea sângelui să se facă dimineața, înainte de masă (Fernandez și Khan, 1971; Trudeau și Freier, 1967; Willis, 1961).

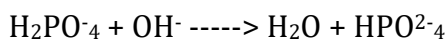
Clorul apare în organism legat de sodiu sub formă de NaCl. Printre rolurile acestui element se numără: reglarea presiunii osmotice, balanței hidrice și echilibrului acido-bazic al organismului, intră în compoziția HCl ca și constituent al sucului digestiv, formarea oaselor, tendoanelor și dinților, acțiune depurativă a ficatului, scăderea glicemiei, colesterolului, acidului uric și ureei din sânge, refacerea tonului muscular.

Fosforul: conținutul total de fosfor în organismul unui adult normal este în jur de 700 – 800 g, din care aproximativ 80÷85% în structura scheletului (predominant fosfat anorganic – hidroxiapatită și fosfat de calciu) iar restul de 15% în fluidele extracelulare (fosfat anorganic) și intracelular în țesuturile moi (fosfat organic) sub formă de: fosfolipide (lecitine, cefaline, sfingom), acizi nucleici, ATP. În sânge, fosforul organic (2/3) este localizat în eritrocite iar cel anorganic (aproximativ 12 mg/dL) în plasmă. În serul sanguin fosfatul anorganic există atât în formă HPO_4^{2-} (componenta bazică) cât și în formă H_2PO_4^- (componenta acidă), raportul $\text{H}_2\text{PO}_4^-/\text{HPO}_4^{2-}$ fiind 1:1 (acidoză), 1:4 în mediu neutru (pH 7,4) și 1:9 (alcalinoză). Prezența celor doi ioni asigură capacitatea tamponare a serului (reglarea pH-ului) astfel:

(i) În mediu acid, componenta bazică asigură creșterea pH-ului prin consumul ionilor H^+ :



(ii) În mediul bazic, prin acțiunea componentei acide pH-ul este redus prin eliberare de OH^- :



Caracterul tampon al fosfaților se manifestă atât în celulele roșii, cât și în celulele tubulilor renali. Raportul dintre ionii fosfat și calciu este aproximativ invers proporțional în sânge. Hormonul paratiroidian crește reabsorbția calciului la nivel renal și inhibă reabsorbția ionilor fosfat (acțiune fosfaturică). La nivelul oaselor și rinichilor, hormonul crește calcemia, fără a crește echivalent concentrația fosfatului. În acest fel se împiedică atingerea unor concentrații critice la care acești ioni formează fosfatul tricalcic insolubil. În realitate, concentrațiile serice ale ionilor de calciu și fosfat depășesc pragul de solubilitate al fosfatului tricalcic, ceea ce teoretic ar presupune precipitarea $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Însă, prezența în sânge a proteinelor și altor metaboliți previne precipitarea (Albu, 2001, Richard și Pincus, 2016; Laboratoarele Synevo (i), 2015).

Determinarea Ca din serul sanguin - Metoda complexometrică

Principiul lucrării

Metoda complexometrică are la bază titrarea în mediu alcalin a calciului din serul sanguin cu soluție de EDTA (complexon III, sarea de sodiu a acidului etilendiaminotetraacetic), folosind ca

indicator murexidul, până la apariția culorii roșu-purpuriu.

Aparatură și reactivi

- Ser sanguin: se recoltează sânge venos *à jeun* în vacutainer fără anticoagulant cu/fără gel separator și se separă serul prin centrifugare. Se respinge specimenul intens hemolizat, lipemic, paraproteic sau contaminat bacterian

- Soluție de complexon III N/10: 1,86 g EDTA dizolvate în 1000 mL apă distilată
- NaOH 36%;
- Indicator Murexid: murexid solid + NaCl solid 1:1000
- Instalație de titrare
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

1 mL ser sanguin se omogenizează cu 25 mL apă distilată, se pun 0,2 mL soluție NaOH, 0,1 g indicator Murexid și după omogenizare se titrează cu complexon III până la viraj al culorii de la roz la violet. În paralel se titrează și o probă de control folosindu-se apă distilată în loc de ser sanguin.

Calculul rezultatelor:

Conținutul de Ca seric se calculează cu relația (1 mL soluție EDTA titrează 0,2 mg Ca²⁺):

$$\text{Ca seric, mg/100 mL ser sanguin} = (n_1 - n_2) \times 10 \quad (4.32)$$

în care:

n_1 – volumul de EDTA utilizat la titrarea probei cu ser fiziologic, mL;

n_2 – volumul de EDTA utilizat la titrarea probei de control, mL;

Se efectuează cel puțin 3 probe iar rezultatul final se prezintă ca valoare medie a acestora și se interpretează rezultatele în raport cu valorile fiziologice normale.

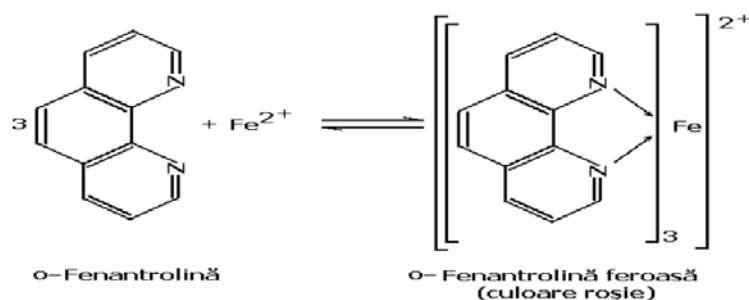
Tabelul 4.32. Determinarea Ca seric total prin titrare cu EDTA

Proba	Volum EDTA folosit la titrarea probei cu ser, mL	Volum EDTA folosit la titrarea probei de control, mL	Conținut total de Ca seric, mg/100 mL ser
Valoare medie:			

Dozarea fierului seric - Metoda Heilmeyer modificată

Principiul lucrării

Metoda are la bază tratarea serului sanguin cu HCl pentru a rupe legăturile Fe^{3+} -proteine. Fe^{3+} eliberat este redus cu hidrochinonă la Fe^{2+} care în urma reacției cu ortofenantrolina sau α, α' -dipiridil formează un compus roșu a cărui intensitate este direct proporțională cu concentrația Fe^{2+} și implicit cu concentrația Fe^{3+} din serul sanguin (Albu, 2001).



Aparatură și reactivi

- Ser sanguin: se recoltează sânge venos *à jeun* în vacutainer fără anticoagulant cu/fără gel separator și se separă serul prin centrifugare. Se respinge specimenul hemolizat, lipemic sau contaminat bacterian

- Soluție de HCl 1N;

- Soluție de CCl_3COOH 20%

- Soluție de hidrochinonă 2%

- Soluție ortofenantrolină clorhidrică 1% (sau ortofenantrolină – pentru a favoriza divolvarea se acidulează soluția cu 2-3 picături de HCl concentrat)

- Soluție semisaturată de CH_3COONa

- Soluție standard concentrată de fier: 0,0497 g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ se omogenizează cu 100 mL cu apă distilată sau 0,0702 g $\text{Fe}(\text{NH}_4)_2(\text{SO}_4)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Se diluează 1 mL la 100 mL cu apă distilată și se obține standardul cu un conținut de 100 μg Fe % (stabilitate 1-2 luni)

- Spectrofotometru UV-VIS

- Sticlărie de laborator

Modul de lucru:

Se prepară 3 probe conform indicațiilor din Tabelul 4.34.

Tabelul 4.34. Prepararea probelor pentru dozarea fierului seric

Reactivi	Proba de analizat	Standard	Blank
Soluție HCl, mL	1	1	1
Ser nehemolizat, mL	2	-	-
Apă bidistilată, mL	-	-	2
Soluție standard de fier (100 µg%)	-	2	-
Agitare, 10 minute repaos			
Acid tricloracetic, mL	2	2	2
10 minute repaos, filtrare			
Filtrat, mL	2	2	2
Soluție hidrochinonă, mL	0,2	0,2	0,2
Soluție o-fenantrolină, mL	0,1	0,1	0,1
Soluție acetat de sodiu, mL	2	2	2
Omogenizare, repaos 5 minute			
Absorbanța la 510 nm în raport cu blank-ul	Ap	As	-

Calculul rezultatelor:

Sideremia se calculează conform ecuației:

$$\text{Fe } \mu\text{g}\% = \text{Cst} \cdot \text{Ap} / \text{As} = 100 \cdot \text{Ap} / \text{As} \quad (4.33)$$

în care:

Cst - concentrația standardului de fier (100 µg/100 mL soluție)

Observații:

Proteina plasmatică care transportă fierul este siderofilina (transferina) care se sintetizează în ficat. Capacitatea totală de fixare a fierului (CTFFE) se exprimă în µg Fe/100 mL plasmă și corespunde cantității totale de siderofilină. Valorile normale ale CTFFE sunt în intervalul 250-420 µg% Fe. În cazul deficitului de transferină au valori scăzute atât CTFFE cât și sideremia. Sideremia este mult scăzută în anemia feriprivă, iar valorile CTFFE sunt crescute, din cauza utilizării fierului plasmatic pentru producerea de hemoglobină. Producția mărită de hemoglobină poate fi cauzată de sarcinile repetate, pierderile cronice de sânge, hemoragii puternice.

Dozarea clorului seric**Principiul metodei**

Metoda are la bază titrarea serului cu o soluție de Hg(NO₃)₂ folosind difenilcarbazona ca indicator, cu formarea cu ionii Hg²⁺ în exces a unui compus violet (Albu, 2001).

Aparatură și reactivi

- Ser sanguin: se recoltează sânge venos *à jeun* în vacutainer fără anticoagulant cu/fără gel separator și se separă serul prin centrifugare. Se respinge specimenul intens hemolizat, lipemic sau contaminat bacterian

- Soluție 0,01 N de $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ - 1 mL soluție corespunde la 0,355 mg Cl⁻
- Soluție de indicator de difenilcarbazonă 0,01 M
- Soluție de H_2SO_4 2/3 N
- Soluție standard de KCl 0,1 N
- Instalație de titrare
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru:

Se prepară soluțiile conform Tabelului 4.35.

Tabelul 4.35. Prepararea probelor la determinare a clorului seric

Reactivi	Proba de analizat	Standard
Apa distilată, mL	1	1
Ser sanguin, mL	0,1	-
Standard KCl, mL	-	0,1
H_2SO_4 , mL	1 picătură	1 picătură
Indicator difenilcarbazonă	2 picături	2 picături
Titrare cu $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ până la culoare violet, mL	V_1	V_2

Calcul rezultatelor

1 mL soluție $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$ 0,355 mg Cl⁻

V_1/V_2 mL soluție $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$X

$$X(\text{mg Cl}^-/0,1 \text{ mL ser}) = 0,355 \cdot V_1/V_2 \quad (4.34)$$

$$\text{mg Cl}^-/100 \text{ mL ser} = 355 \cdot V_1/V_2 \quad (4.35)$$

$$\text{mEq Cl}^-/L = 100 \cdot V_1/V_2 \quad (4.36)$$

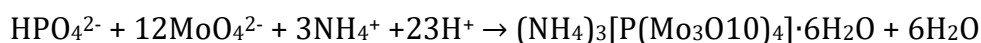
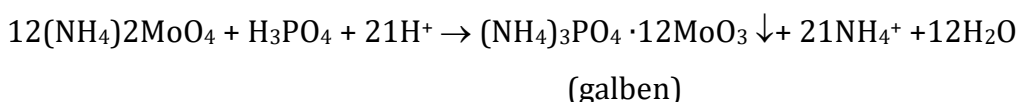
Observații

Se efectuează deproteinizarea în cazul serurilor puternic icterice. În acest caz, culoarea indicatorului la viraj tinde spre albastru, față de violet în cazul serului neproteinizat.

Dozarea fosfatului anorganic seric - Metoda Briggs cu deproteinizare

Principiul metodei

În laboratoarele clinice se dozează doar fosforul anorganic, metoda implicând o deproteinizare a serului în prezenta acidului tricloracetic urmată de o reacție în mediu acid a fosfatului din filtrat cu molibdatul de amoniu cu formarea unui precipitat de culoare galbenă (molibdatul de amoniu). Acesta este redus de către hidrochinonă cu formare de oxizi de molibden dispersați în apă de culoare albastră a cărui intensitate se citește la 600 nm și este direct proporțională cu concentrația de fosfat anorganic din probă (Albu, 2001, Richard și Pincus, 2016):



Aparatură și reactivi

- Ser sanguin: se recoltează sânge venos *à jeun* în vacutainer fără anticoagulant (cu excepția heparinei ceilați anticoagulanți interferă și dau rezultate false mai reduse) cu/fără gel separator și se separă serul prin centrifugare. Se va evita staza cu garoul. Se recomandă recoltarea de ser dimineața devreme deoarece pe durata zilei concentrația variază semnificativ, scăzând după mese. Prin depozitare îndelungată la temperatura camerei conținutul de fosfor crește. Se respinge specimenul hemolizat (eritrocitele contin niveluri ridicate de esteri organici care pot hidroliza, pun în libertate fosfor anorganic și se obțin rezultate mai ridicate), lipemic sau contaminat bacterian.

- Acid tricloracetic 20%

- Soluție de molibdat de amoniu în mediu acid: 25 g molibdat de amoniu se dizolvă în 300 mL H₂O distilată, se adaugă 75 mL H₂SO₄ conc. Și se aduce la semn la 500 mL cu apă distilată

- Soluție de 1% hidrochinonă acidulată cu o picătură de H₂SO₄ concentrat

- Soluție 20% de sulfat de sodiu

- Soluție de fosfat standard stoc (2 mg P/mL) preparată din soluție etalon de KH₂PO₄

- Soluție de fosfat standard de lucru (20 μg P/mL) preparată prin diluarea soluției stoc de fosfat

- Spectrofotometru UV-VIS

- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

A. Construcția dreptei de calibrare: se prepară soluțiile indicate în Tabelul 4.36.

Tabelul 4.36. Prepararea soluțiilor pentru construirea dreptei de calibrare la dozarea fosfatului anorganic seric

Reactivi	Număr eprubetă			
	1	2	3	4
Soluție standard de P (1mL = 20 μgP)	0,5	1	3	5
Acid tricloracetic, mL	2	2	2	2
Apă bidistilată, mL	7,5	7	5	3
Volum amestec din fiecare eprubetă, mL	5	5	5	5
Soluție de molibdat de amoniu, mL	1	1	1	1
Soluție de sulfat de sodiu, mL	1	1	1	1
Soluție de hidrochinonă, mL	1	1	1	1
Apă distilată, mL	2	2	2	2
Omogenizare, repaos 30 minute				
Absorbanța la 600 nm în raport cu blank-ul	A1	A2	A3	A4

Se reprezintă grafic variația Absorbanța probelor = f(concentrația fosfatului în probe) și se extrage ecuația de variație.

B. Determinarea concentrației fosfatului anorganic în ser: se prepară probele conform Tabelului 4.37.

Tabelul 4.37. Prepararea probelor de analizat la fosfatului anorganic

Reactivi	Proba de analizat	Blank
Ser, mL	2	-
Apă bidistilată, mL	4	5
Acid cloracetic, mL	4	-
Agitare, repaos 10 minute, filtrarea probei de analizat		
Filtrat, mL	5	-
Soluție de molibdat de amoniu, mL	1	1
Soluție de hidrochinonă, mL	1	1
Soluție de sulfat de sodiu, mL	1	1
Apă distilată, mL	2	2
Omogenizare, repaos 30 minute		
Absorbanța la 600 nm față de blank		

Pe baza dreptei ecuației Absorbanța probelor = f(concentrația fosfatului în probe) obținută la punctul A și a absorbantei probei de analizat (punctul B) se determină concentrația fosfatului anorganic în proba de analizat (fosfatemia).

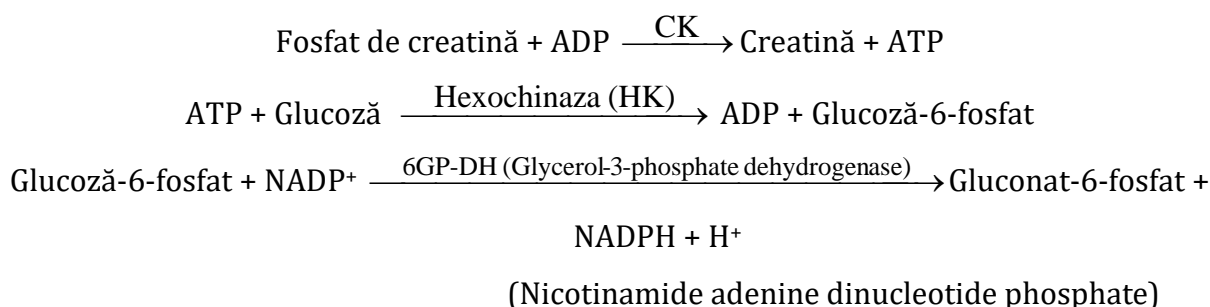
Determinarea creatinkinazei folosind spectrofotometrul BioSystems BTS 350

Aspecte generale

Creatinkinaza (CK) este o enzimă care joacă un rol important în mușchi prin furnizarea ATP, atunci când mușchiul se contractă, din ADP și folosind creatină fosfat ca rezervor de fosforilare. CK seric provine în principal din mușchi și concentrația sa depinde de o serie variabile fiziologice (sex, vârstă, masă musculară, activitate fizică și rasă).

Principiul metodei (Prospect Glucoză – BioSystems, 2022)

Metoda are la bază acțiunea catalitică a creatinkinazei (CK) de fosforilare a ADP în prezența creatinfosfatului rezultând ATP și creatină. ATP-ul format fi implicat într-o serie de reacții care conduc la formarea de NADPH a cărui absorbantă se citește la 340 nm:



Aparatură și reactivi

- Ser și plasmă recoltate prin proceduri standard
 - Reactiv A: imidazol 125 mmol/L, magnesium acetate 12.5 mmol/L, EDTA 2 mmol/L, Dglucose 25 mmol/L, hexokinase 6000 U/L, NADP 2.4 mmol/L, pH 6.7, N-acetyl cysteine 25 mmol/L,
 - Reactiv B: fosfat de creatină 250 mmol/L, ADP 15 mmol/L, AMP 25 mmol/L, P1, P5-di(adenosina-5'-)pentafoșfat 102 μmol/L, glucoză-6-fosfat dehidrogenază 8000 U/L
 - Reactiv de lucru: se adaugă conținutul unui flacon B peste reactivul A și se amestecă ușor.
- Pentru pregătirea altor volume se omogenizează 4 mL reactiv A + 1 ml reactiv B
- Spectrofotometru BioSystems BTS-350
 - Sticlărie de laborator

Mod de lucru (cf. Prospect – Creatinkinază, BioSystems, 2022)

A. Pregătirea probelor pentru analiza creatinkinază (Tabelul 4.38).

Tabelul 4.38. Compoziția soluțiilor folosite pentru dozarea creatinkinază

Reactiv	Ser control biochimic I	Ser control biochimic II	Probă
Reactiv de lucru	1 mL	1 mL	1 mL
Ser control I (normal)	50 μ L	-	-
Ser control II (patologic)	-	50 μ L	-
Probă	-	-	50 μ L
Se citește absorbanta probelor la 340 nm la 3 minute de la amestecare	A _{SI3}	A _{SII3}	A _{P3}
Se citește absorbanta probelor la 340 nm după 1 minut	A _{SI4}	A _{SII4}	A _{P4}
Se citește absorbanta probelor la 340 nm după 1 minute	A _{SI5}	A _{SII5}	A _{P5}
Se citește absorbanta probelor la 340 nm după 1 minute secunde	A _{SI6}	A _{SII6}	A _{P6}
Se citește absorbanta probelor la 340 nm la 150 secunde	A _{SI150}	A _{SII150}	A _{P150}
Se citește absorbanta probelor la 340 nm la 180 secunde	A _{SI180}	A _{SII180}	A _{P180}
Se calculează creșterea medie a absorbantei pe minut ($\Delta A/\text{min}$)			

B. Utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350:

B.1. Introducerea/Verificarea metodei de analiză -introduce/ verifică parametrii specifici analizării analitului: concentrațiile standardelor, blank, controlul, liniaritatea metodei, numărul de replici, unitatea de măsură, lungimea de undă folosită la citire, etc.

B.2. Măsurarea concentrației analitului investigat în probe citește absorbanțele probelor și afișează rezultatul.

În Anexa 3.1. se exemplifică utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350 la analiza acidului uric urinar. Pentru determinarea activității creatinkinazei, se parcurg aceiași pași, alegând din meniurile *Programare* și *Concentrații* metoda pentru creatinkinază.

Calculul rezultatelor

Activitatea creatinkinazei este calculată cu relația:

$$\text{Creatinkinaza (U/L)} = \Delta A/\text{min} * \frac{V_t * 10^6}{\epsilon * l * V_s} \quad (4.37)$$

unde:

ϵ – absorbanța molară a 4-nitrofenol la 340 nm = 6300

l – lungimea traseului luminos = 1 cm

V_t – volumul total de reacție = 1,05 mL

V_s – volumul probei = 0,05 mL

1 U/L – reprezintă 16,67 μ kat/L.

Inserând valorile în formulă, se obțin relațiile:

$\Delta A/\text{min}$	$\times 3333 = \text{U/L}$
	$\times 55561 = \mu\text{kat/L}$

Valori de referință orientative

Temperatura de reacție	Bărbați		Femei	
	U/L	μ kat/L	U/L	μ kat/L
25°C	10,65	167 – 1084	7 – 55	117 – 917
30°C	15 – 105	250 – 1750	10 – 80	167 – 1334
37°C	38 – 174	633 – 2900	26 – 140	433 – 2334

- copiii prezintă valori ale creatinkinazei mai ridicate decât adulții

- concentrația serică a CK este semnificativ crescută la pacienții cu boli ale mușchilor scheletici (distrofie musculară, miozită, polimiozită, hipertermie malignă, traumatisme, rabdomioliză acută), a sistemului nervos central (boală boala cerebrovasculară acută, ischemie cerebrală, sindromul Reye) și tiroidă (hipotiroidism)

- niveluri crescute de CK sunt observate în decurs de 3-6 ore de la un infarct miocardic atingând valorile maxime la 24-36 ore. Concentrația revine la normal în 3-4 zile deoarece enzima este eliminată rapid din plasmă.

Dozarea Imunoglobulinei G (Ig G)

Aspecte generale

IgG este principala clasă de imunoglobuline produse de celulele plasmatiche, reprezentând aproximativ 75% din totalul imunoglobulinelor.

Principiul metodei

Metoda are la bază precipitarea imunoglobulinei G din proba de analizat în prezența anticorpilor anti-imunoglobulina G umană. Complexul antigen-anticorp determină dispersia radiației luminoase proporțional cu concentrația de IgG și se măsoară turbidimetric.

Aparatură și reactivi

- Ser/plasmă recoltate prin procedură standard (heparina, EDTA ca și anticoagulanți)
- Reactiv A: tampon imidazol 0,1 mol/L, anticorpi de capră anti IgG, azidă de sodiu 0,95 g/L, pH = 7,5
- Calibrator de proteine: 5 niveluri de concentrație a IgG pentru trasarea dreptei de calibrare
- Spectrofotometru UV-VIS
- Baie termostată
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

A.1. Construcția dreptei de calibrare: se prepară soluțiile indicate în Tabelul 4.39.

Tabelul 4.39. Prepararea soluțiilor pentru construirea dreptei de calibrare la dozarea Ig G

Reactivi	Număr standard				
	St 1	St 2	St 3	St 4	St 5
Standard (calibrator de proteine)	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L	10 μ L
Reactiv A	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL	1,5 mL
Absorbanța la 540 nm					

Se reprezintă grafic variația Absorbanța standarde = f(concentrația IgG în standarde) și se extrage ecuația de variație.

A.2. Determinarea concentrației IgG în probele de analizat: se prepară probele conform Tabelului 4.40.

Tabelul 4.40. Prepararea probelor de analizat la analiza Ig G

Reactivi	Blank	Proba de analizat
Blank (apă distilată)	10 μ L	-
Ser	-	10 μ L
Reactiv A	1,5 mL	1,5 mL
Absorbanța la 540 nm		

Pe baza dreptei ecuației Absorbanța standarde = f(concentrația Ig în standarde) obținută la punctul A și a absorbantei probei de analizat (punctul B) se determină concentrația IgG în proba de analizat.

B. Utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350:

B.1. Introducerea/Verificarea metodei de analiză -introduce/ verifică parametrii specifici analizării analitului: concentrațiile standardelor, blank, controlul, liniaritatea metodei, numărul de replici, unitatea de măsură, lungimea de undă folosită la citire, etc.

B.2. Măsurarea concentrației analitului investigat în probe citește absorbanțele probelor și afișează rezultatul.

În Anexa 3.1. se exemplifică utilizarea spectrofotometrului BioSystems BTS-350 la analiza acidului uric urinar. Pentru determinarea activității IgG, se parcurg aceiași pași, alegând din meniurile *Programare* și *Concentrații* metoda pentru IgG.

Valori de referință orientative

Ser adulți: 700 – 1600 mg/dL

Observații

Concentrații scăzute lae IgG plasmatic: deficiență dobândită sau innăscută ale sintezei de imunoglobuline

Concentrații ridicate ale IgG (hiperimunoglobulinemia) apar în răsunsurile autoimune, hepatitele cronice, mielom multiplu, afecțiuni proliferative ale celulelor plasmatic

5. ANALIZA SUCULUI GASTRIC

Aspecte generale

Sucul gastric este un lichid secretat de către celulele mucoasei gastrice, fiind rezultatul amestecării a două secreții: *secreție primară acidă* (secreția parietală a glandelor fundice) alcătuită din soluție apoasă de HCl și *secreție primară alcalină* (secreția neparietală a zonei antropilorice) care conține mucus, proteine, Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻ și HCO₃²⁻. Amestecul celor două secreții conduce la obținerea sucului gastric (pH = 1-2) care conține: (i) HCl cu rol de activare a enzimelor proteolitice din sucul gastric, inactivare a amilazai salivare, descompunere a proteinelor alimentare făcându-le mai ușor digerabile, stimulare evacuării gastrice, acțiune antiseptică (împiedică dezvoltarea microorganismelor introduse în stomac de către alimente); (ii) *enzime*: a) *pepsina* este secretată în forma ei inactivă (pepsinogen) și activată de HCl; are rolul de a hidroliza proteinele până stadiul de peptide; b) *labfermentul (chimozină)* este secretat la sugari, dar este absent la adulți; coagulează laptele și transformă cazeinogenul (solubil) în paracazeină; această în prezența ionilor Ca²⁺ se transformă în paracazeinat de calciu împiedicând astfel trecerea rapidă a laptelui în intestine; c) *gelatinaza* cu rol în hidroliza gelatinei; d) *lipaza gastrică* care scindează lipidele; (iii) mucus cu rol în protejarea mucoasei gastrice de acțiunea HCl; (iv) *substanțe anorganice* (Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Cl⁻ și HCO₃²⁻).

Principiul lucrării

Lucrarea are ca scop determinarea acidității totale, libere și legate a sucului gastric prin titrare cu soluție de NaOH 0,1 N folosind indicatorul Töpfer. *Aciditatea liberă* reprezintă concentrația H₃O⁺ proveniți din HCl liber din sucul gastric. *Aciditatea legată* reprezintă concentrația H₃O⁺ legați de fosfați acizi, acizi carboxilici, proteine și alți compuși prezenți în sucul gastric. *Aciditatea totală* se obține prin suma acidității libere și legate, fiind definită ca suma ionilor de H₃O⁺ care se pot titra cu NaOH 0,1 N (Albu, 2001).

Aparatură și reactivi

- Suc gastric recoltat prin tubaj gastic: se recoltează dimineața prin introducerea unui tub subțire de cauciuc închis în partea dinspre bolnav până la ajungerea în stomac. Se va evita înghițirea salivei pentru a nu se amesteca cu sucul gastric. Pentru stimularea secreției de suc gastric pacientul va bea o soluție de slabă de alcool sau i se va face o injecție cu o fiolă de histamină.

Înainte de recoltare pacienții nu vor consuma alimente, băuturi, nu vor fuma, nu vor lua medicamente și acolo unde este cazul își vor îndepărta proteza dentară

- Soluție NaOH 0,1 N de factor cunoscut (F_{NaOH})
- Indicator Töpfer: 0,25 g p-dimetilaminoazobenzen amestecat cu 2 g fenolftaleină și 100 mL alcool etilic 96%
- Instalație de titrare
- Sticlărie de laborator

Analiza fizică a sucului gastric

Aspect: culoare gri deschis, translucenț

Volumul: 1200 mL/zi – 1500 ml/zi

pH-ul: extrem de acid, 0,9 – 1,2, datorită prezenței HCl

Densitate: 1,002 g/cm³ – 1,004 g/cm³

Determinarea acidității sucului gastric

B.1. Determinarea acidității libere

Se introduc câte 10 mL suc gastric în trei flacoane Erlenmeyer, se pun 1-2 picături de indicator Töpfer și se titrează cu NaOH 0,1 N până la culoare portocalie. Se citesc volumele de NaOH 0,1 N folosite la titrare (V_1).

B.2. Determinarea acidității totale

Se continuă titrarea începută pentru determinarea acidității libere până la apariția culorii roșii și se notează volumul total de NaOH folosit (V_2) (<https://www.romedic.ro/explorarea-secrețiilor-digestive-0C395>)

Calculul rezultatelor

Rezultatele se exprimă în unități clinice (UC): volumul (mL) de NaOH 0,1 N folosit la titrarea unui volum de 100 mL suc gastric.

$$\text{Aciditatea liberă (UC)} = V_1 \times F_{\text{NaOH}} \times 10 \quad (5.1)$$

$$\text{Aciditatea totală (UC)} = V_2 \times F_{\text{NaOH}} \times 10 \quad (5.2)$$

$$\text{Aciditatea legată (UC)} = \text{Aciditate totală} - \text{Aciditate liberă} \quad (5.3)$$

Testarea prezenței constituenților anormali în sucul gastric (Tabelul 5.1).**Tabelul 5.1.** Reacții de identificare a constituenților anormali în sucul gastric

Constituentul	Reactiv de identificare	Culoarea obținută	Observații
Pigmenți biliari	Albastru de metilen	Verde	Indică prezența pigmentilor biliari
	Reactiv diazo	Roz	Indică prezența pigmentilor biliari
	Reactiv Fouchet	Albastru/verde	Confirmă prezența pigmentilor biliari
Săruri biliare	Floare de sulf	Floarea de sulf se scufundă la baza eprubetei	Indică prezența sărurilor biliare
	Pettenkoffer	Inel violet închis la joncțiunea celor două soluții	Confirmă prezența sărurilor biliare
Sânge	Benzidină + H ₂ O ₂	Culoare albastru/verde	Prezența sângelui
Amidon	Iod	Culoare albastră/violet	Prezența amidonului

6. ANALIZA LICHIDULUI CEFALORAHIDIAN (CEREBROSPINAL, LCR)

Aspecte generale

Lichidul cerebrospinal (LCR) este produs în plexurile coroide ale ventriculelor creierului și se găsește în sistemul ventricular și spațiul subarahnoid al întregului sistem nervos central (creier și maduva spinării). Rolul LCR este de a sprijini mecanic creierului, de a transporta compuși biochimici diferiți, în special neuromodulatori, de a îndepărta diverși metaboliți și de a menține homeostaza biochimică la nivelul sistemului nervos central. Compoziția biochimică a LCR este bine stabilită, abaterile fiind investigate pentru diagnosticarea unor boli.

Analiza fizică a LCR

Principiul lucrării

Lucrarea își propune să investigheze LCR din punct de vedere al culorii, transparenței și densității (Albu, 2001).

Aparatură și reactivi

- Lichid cerebrospinal: se recoltează prin puncție lombară de către personal specializat în containere sterile. Probele se transportă la 20-35⁰C și se procesează cât mai repede posibil. Se va evita expunerea la temperaturi extreme (refrigerare, căldură excesivă), lumina soarelui. Nu se îngheață probele pentru biochimie, serologie, diagnostic molecular înainte de microscopie și cultura bacteriană. În schimb, probele pot fi păstrate la -80⁰C pentru teste PCR.

- Areometru

Mod de lucru

Se analizează culoarea, transparența și densitatea (se măsoară folosind areometrul) LCR recoltat și se compară cu caracteristicile normale ale CRL:

Culoarea: LCR al pacienților sănătoși este limpede și incolor. Culoarea galbenă, roz sau verzui prezentă în unele afecțiuni este cauzată de prezența bilirubinei sau biliverdinei, indicând o hemoragie la nivelul SNC. Când LCR este colorat în roșu sugerează prezența sângelui provenit fie dintr-o afecțiune, fie datorită unei puncții greșit efectuate.

Transparența: LCR normal este transparent. Poate fi opalescent în unele afecțiuni ca urmare a prezenței într-o cantitate ridicată a albuminei, leucocitelor sau microorganismelor. În

meningitele purulente LCR este turbure. Probele de LCR vor forma o peliculă de fibrină la suprafață în cazul meningitei tuberculoase.

Densitatea: LCR normal are densitatea 1,006-1,008 g/cm³, apropiată de aceea a apei. Aceasta crește în unele patologii.

Analiza chimică a LCR

Analiza glucozei în LCR (glicocorahia)

Principiul lucrării

Metoda de evaluare orientativă a hipo- și hiperglicorahiei are la bază reacția dintre glucidele prezente în LCR și reactivul Fehling. Pentru anumite diluții ale LCR, poate avea loc o reducere ușoară sau nulă a reactivului Fehling. LCR cu conținuturi mari de glucoză, cu concentrații normale sau scăzute se comportă diferit (Albu, 2001, Bioclinica, MedCenter).

Aparatură și reactivi

- Lichid cerebrospinal: se recoltează *a jeun* și se transportă la laborator fără a fi refrigerată sau termostată; lichidul este stabil 3 zile la 18-25°C și mai mult de 1 lună la 2-8°C; se evită expunerea la temperaturi extreme (refrigerare, căldură excesivă), lumina soarelui.

- Reactiv Fehling

Mod de lucru

Se prepară soluțiile indicate în Tabelul 6.1.

Tabelul 6.1. Dozarea hipo- și hiperglicorahiei

Reactivi	Eprubeta I hipoglicorahie	Eprubeta II hiperglicorahie
LCR, mL	2,0	0,6
Apă distilată	-	2,0
Reactiv Fehling, mL	0,2	1,0
Fierbere 5 minute pe baie de apă		
Hipoglicorahie	Negativ (albastru)	Negativ (albastru)
Normoglicorahie	Negativ (albastru)	Pozitiv (roșu)
Hiperglicorahie	Pozitiv (roșu)	Pozitiv (roșu)

Analiza *proteinelor totale, acidului lactic, elemente minerale (Na⁺, K⁺, Cl⁻)* se face similar cu cele folosite pentru analiza acestor parametrii în sânge.

7. ANALIZA MATERIILOR FECALÉ

Aspecte generale

Materiile fecale sunt reziduuri rezultate din digestie neabsorbite de organism și excretate la finalul tranzitului digestiv. Acestea conțin: materii uscate (reziduuri alimentare, reziduuri celulozice), apă, leucocite, bacterii, celule intestinale descumate. Fecalograma (analiza chimică a materiilor fecale) are ca scop decelarea tulburărilor de digestie intestinală și de absorbție.

Identificarea sângelui din scaun – Metoda Gregersen

Principiul metodei

Cel mai frecvent, sângele apare în scaun în urma afectării hemoroizilor pe durata defecării. Sângerări de obicei oculteă (invizibile cu ochiul liber) rezultate din tumorile colonului se pot decela cu această metodă. Sângerările gastrice se pot uneori manifesta prin prezența sângelui proaspăt în fecale (tranzitul intestinal este accelerat și sângele nu are timp să fie digerat), iar *melena* (scaun negru) apare frecvent în caz de hemoragie digestivă superioară.

Metoda are la bază extracția în eter a sângelui din scaun și evidențierea lui în extractul eteric cu ajutorul benzidinei (Albu, 2001).

Reactivi și echipamente

- Probă de scaun: proba se recoltează după trei zile de regim strict: se evită carnea, alimentele bogate în clorofilă, deoarece prezența mioglobinei și clorofilei dau rezultate fals pozitive
- Acid acetic glacial
- Eter etilic
- Soluție H₂O₂ 10%.
- Soluție de benzidină 2% în acid acetic glacial
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

Proba de scaun amestecată cu 2-3 picături de apă, se omogenizează cu acid acetic glacial (2:1) și se amestecă într-o pâlnie de agitare cu o cantitate egală de eter. Faza apoasă inferioară se scurge. Faza eterică se amestecă cu câteva picături de amestec format din H₂O₂ și 2 mL soluție de benzidină. În caz pozitiv (prezența sângelui) proba se va colora în verde.

Identificarea se poate efectua turnând peste proba de analizat un amestec format din soluție de benzidină:acid acetic glacial:apă oxigenată. Scurgerea unui lichid verde indică prezența sângelui.

Evidențierea glucidelor, lipidelor și proteinelor din scaun

Principiul lucrării

Glucidele apar în scaun în urma malabsorbțiilor glucidice. Secreția deficitară de amilază pancreatică conduce la apariția în scaun a amidonului și dextrinelor. Identificarea acestora se face cu ajutorul reacțiilor de culoare (Albu, 2001). Cantitatea de lipide eliminată în scaun în condiții normale este redusă. Cantități ridicate de lipide nedigerate apar în scaun în stări care au consecință malabsorbția lipidică, în deficitul de acizi biliari datorat obstrucției căilor biliare, secreției insuficiente de lipază pancreatică sau incapacității hepatice de secreție a acizilor biliare. Prezența lipidelor în cantitate mare în scaun (steatoree) îi conferă un luciu specific iar în urma amestecării cu apă se ridică la suprafață pete de grăsime (Albu, 2001). Deficitul digestiei proteice ca rezultat al secreției insuficiente de proteaze pancreatice are ca rezultat apariția fibrelor proteice în scaun. Aceste se pun în evidență prin examinare la microscop (Albu, 2001).

Reactivi și echipamente

- Probă de scaun proaspăt eliminat
- Reactiv Lugol
- Reactivi folosiți pentru identificarea glucidelor în urină
- Reactiv Sudan III (roșu Sudan)
- Microscop, Sticlărie de laborator

Mod de lucru

A. Identificarea glucidelor reducătoare (glucoză, fructoză)

Se folosesc reacțiilor specifice indicate în secțiunea *Identificarea glucidelor urinare*: reacțiile Barfoed, Nylander, Benedict, Seliwanoff.

B. Identificarea polizaharidelor nedigerate

La proba de scaun se adaugă câteva picături de reactiv Lugol care va da o colorație albastră în prezența amidonului nedigerat. Compușii intermediari de digestie (dextrinele) vor da o colorație roșie.

C. Identificarea lipidelor din scaun

Lipidele nedigerate din scaun se colorează în roșu la adăugarea câtorva picături de reactiv Sudan III.

D. Identificarea proteinelor din scaun

Preparatul fără colorație (nativ) al probei de scaun se examinează la microscop pentru identificarea fibrelor musculare nedigerate.

8. ANALIZA UNGHIILOR ȘI PĂRULUI

Aspecte generale

Unghia omului este una din cele mai inaccesibile structuri biologice, gradul de penetrare al acesteia de către agenții chimici fiind foarte redus. Aceasta este formată dintr-un strat de celule moarte din epitelium. Structural, unghia este o matrice complexă formată din keratina, o proteină insolubilă bogată în sulf. Keratina include o clasă largă de proteine care se regăsesc și în epiteliu. Keratina se clasifică, în funcție de structura ei, în α -keratina dură și α -keratina moale. α -keratina dură are un conținut ridicat de cistină comparativ α -keratina moale. α -keratina este organizată sub formă de lanțuri polipeptidice α -elicoidale, structurate în filamente intermediare, bogate în aminoacizi (lizina, acid aspartic, acid glutamic și leucina) și relativ sărace în cistina și prolina. Gradul de hidratare al unghiilor este considerat a fi cel mai important factor care influențează proprietățile fizice ale unghiilor exprimate prin modificări în structura keratinei. Modificări structurale și vizuale ale keratinei pot fi induse atât de existența unor boli: osteoporoză, hipotiroidism, tuberculoză, diabet cât și de medicație, expunerea la droguri, toxine și poluanți.

Structura stratificată foarte bine organizată a părului îi conferă acestuia o rezistență crescută la factorii externi. Marea sa stabilitate este datorată unei structuri centrale helicoidale de keratină și a unui număr foarte mare de legături disulfidice între diferite părți ale helixului. Deși o serie de factori (vremea, vopsirea, tratamentele termice, etc.), pot conduce la deteriorarea structurii părului (uscarea, friabilitate, scăderea rezistenței mecanice, etc.) morfologia a acestuia este strâns legată de stilul de viață și de starea de sănătate ale omului (Nowak și Chmielnicka, 2000; Barba, 2009).

Scopul lucrării este de a determina conținutul unor metale în probe de păr (scalp și barbă) provenite de la persoane diferite pentru evidențierea influenței unor factori (vârsta, sex, poluare, starea de sănătate, etc.). Metoda are la bază calcinarea probelor de păr pentru îndepărtarea substanței organice, solubilizarea cenușii și citirea concentrației elementelor minerale folosind spectrometrul de absorbție atomică.

Studiul modificărilor structurale ale unghiilor folosind tehnica FTIR

Principiul metodei

Lucrarea își propune să analizeze conținutul unor metale în unghiile (de la mâini și

picioare) provenite de la diferite persoane (sănătoase, bolnave) și să interpreteze rezultatele în raport cu o serie de date caracteristice persoanelor implicate în studiu (Mihaly Cozmuta și Mihaly Cozmuta, 2019).

Reactivi și echipamente

- Probe de unghii provenite de la persoane sănătoase și persoane bolnave (diabet, osteoporoză, panariții, etc.)
- KBr calitate spectrală
- Spectrometru FTIR
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

Probele de unghiile se spală cu apă distilată, se usucă la 37°C, se macină până la stadiul de pulbere și se formează pastilele: 5 mg pulbere de unghii se amestecă cu 300 mg KBr de calitate spectrală și se presează. Spectrele IR ale pastilelor formate se citesc la FTIR în domeniul 400 cm⁻¹–4000 cm⁻¹. Se extrage din spectrele unghiilor spectrul aerului (background).

Prezentarea rezultatelor

Se discută comparativ, spectrele diferitelor unghii evidențiind modificările spectrelor în raport cu spectrul unghiilor provenite de la persoane sănătoase

Observații

În spectrul FTIR unghiilor persoanelor care nu au diabet banda amide I se observă în jurul lungimii de undă 1640 cm⁻¹ (1626, 1632 și 1638 cm⁻¹), banda aflată la 1637 cm⁻¹ este atribuită structurii amidă I cu forma β-plană. Banda amide II nu apare iar banda amide III apare la 1250 cm⁻¹ (Farhan și colab., 2011; Marshal și colab., 1991; Egawa și colab., 2003). În cazul persoanelor care au diabet banda amidă I de la 1650 cm⁻¹ este atribuită structurii α-helix, banda amidă II apare la 1540 cm⁻¹ iar banda amidă III la 1250 cm⁻¹.

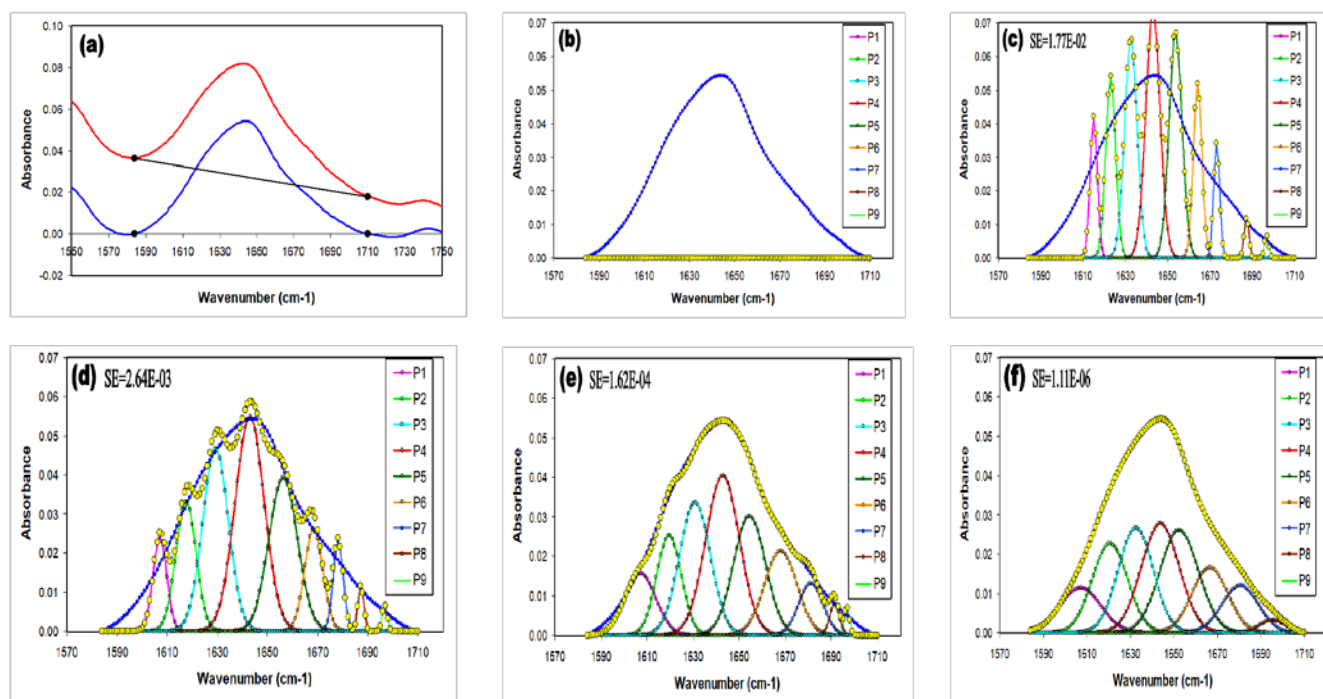


Figura 8.1. Deconvolutia spectrelor FTIR ale unghiilor pentru măsurarea structurii proteice a unghiilor

Specierea elementelor minerale în unghii și păr

Principiul metodei

Lucrarea își propune să analizeze conținutul unor metale în unghiile și părul provenite de la diferite persoane (sănătoase, bolnave) și să interpreteze rezultatele în raport cu o serie de date caracteristice persoanelor implicate în studiu. Metoda are la bază calcinarea probelor de unghii păr pentru îndepărtarea substanței organice, solubilizarea cenușii și citirea concentrației elementelor minerale folosind spectrometrul de absorbție atomică (Were și colab., 2008; Slotnick și colab., 2006; Ohno și colab., 2007).

Aparatură și reactivi

- Probe de unghii și păr
- Metanol
- HNO₃
- HClO₄
- Acetonă
- H₂O₂

- LaCl_3 1%
- Spectrometru de absorbție atomică
- Cuptor de dezagregare cu microunde Berghof (WMS-2)
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

A. Pregătirea probelor

Unghiile (aproximativ 0,5 g) se spală timp de 30 minute la temperatura camerei cu o soluție 1% de detergent. Clătirea se face cu apă deionizată. Se usucă peste noapte la 105°C.

Probele de păr se spală timp de 15 minute, sub agitare magnetică cu apă bidistilată și apoi în succesiunea: acetonă-apă-apă-apă-acetonă, se usucă la 40°C timp de 12 ore.

B. Dezagregarea și solubilizarea probelor de unghii

Dezagregarea uscată a probelor de unghii: Peste proba uscată se adaugă 6 mL de HNO_3 , se lasă 1 h la temperatura camerei pentru reacție, se adaugă 1 mL HClO_4 și se încălzește la 200°C până la îndepărtarea fumului dens și obținerea unei soluții limpezi. Soluția se aduce la volum de 5 mL cu apă deionizată.

Dezagregarea umedă a probelor de unghii: Peste proba uscată se amestecă cu 1 mL HNO_3 și 0,5 mL HClO_4 . Soluția se aduce la volum de 5 mL cu apă deionizată.

Dezagregarea probelor folosind cuptorul cu microunde Berghof (WMS-2): 50 mg probă se introduce în vasul de digestie și se introduce 2,5 mL HNO_3 și se omogenizează. Se lasă în repaos cel puțin 20 minute înainte de închiderea vasului și apoi se introduce în cuptor. Digestia are loc la următorii parametri:

Pasul	1	2	3	4
Temperatura, °C	130	155	170	100
Putere, %	80	80	80	20
Timp, minute	8	5	12	5

Odată terminată dezagregarea, se așteaptă răcirea vasului de dezagregare până la temperatura camerei și se deschide ușor capacul evitând contactul cu fumul care se degajă în cantitate mare. Soluția este transferată într-un balon cotat și adusă la semn.

C. Dezagregarea și solubilizarea probelor de păr

0,5 g probă pregătită ca mai sus se amesteca cu 2,5 mL HNO_3 concentrat și se introduce în cuptorul de dezagregare cu microunde respectând următorul program (MWS-2):

Pasul	1	2	3	4
Temperatură,	130	155	170	100

°C				
Putere, W	89	80	80	20
Timp, minute	8	5	12	5

Odată terminată dezagregarea se așteaptă răcirea vasului de dezagregare până la temperatura camerei și se deschide ușor capacul evitând contactul cu fumul care se degajă în cantitate mare. Soluția este transferată într-un balon cotat și adusă la semn. Solubilizarea cenușii se face în vase de teflon folosind HNO₃, soluției rezultate adăugându-i-se HClO₄. În cazul determinării Ca²⁺ se adaugă 2 mL LaCl₃ 1%.

D. Determinarea conținutului metalic

Se folosește spectrometrul de absorbție atomică la lungimile de undă corespunzătoarelor ionilor analizați, folosind ca blank acidul sau amestecul acid cu aceeași compoziție și proporție ca cel folosit la dezagregarea probelor. Rezultatele se trec în Tabelul 8.1.

Tabelul 8.1. Rezultate experimentale

Metalul	Concentrația mg/Kg	Genul	Categoria de vârstă	Starea de sănătate	Fumător/ nefumător
Zn						
Cu						
....						

și se interpretează rezultatele obținute (se face corelație și cu conținutul metalic din păr, unghii).

9. ANALIZA CALCULILOR

Aspecte generale

Calculii sunt formațiuni solide care apare ca urmare a precipitării unor compuși chimici aflați în concentrații mai ridicate în urină, bilă sau salivă. În funcție de timpul în care se formează, de locul formării, de substanța care cristalizează, calculii pot fi alcătuiți dintr-un singur compus chimic sau mai mulți și au caracteristici fizico-chimice diferite (www.reginamaria.ro).

Calculii renali pot avea formă orizontală, ascuțită, rotundă, neregulată, cu ramuri, mărimile putând varia de la cea a unui grăunte de nisip până la cea a unei mingi de golf mai mare. Calculii comuni conțin , fosfat de calciu, acid uric, oxalat de calciu, struvit, iar cei mai rari pot conține cistină sau medicamente. **Calculii care conțin oxalați** sugerează excreție în urină a excesului de calciu, oxalat sau uneori puțin citrat, legați în mod obișnuit de ionii Ca^{2+} . **Calculii cu acid uric** apar în prezența gutei sau a tulburărilor metabolice ale acidului uric. **Calculii struvit (fosfat de amoniu și magneziu)** rezultă în urma infecțiilor bacteriene care produc amoniac în exces. **Calculii de cistină** apar în general ca urmare a unui exces moștenit de excreție a cistinei. **Calculii din medicamente** apar după ingestia îndelungată a anumitor medicamente (triamteren, guaifenesin, indinavir, atazanavir și medicamente cu sulf). Factorii care favorizează apariția calculilor urinari sunt: anomalii ale structurilor rinichilor și/sau ale tractului urinar împiedică curgerea urinei, infecții ale tractului urinar, tulburări renale (rinichi polichistic).

Calculii biliari apar frecvent în vezica biliară, dar se pot produce în orice zonă a tractului biliar, fiind predominanți la femeile și la persoane cu vârstă înaintată. Calculii biliari se formează în urma cristalizării componentelor chimici din bilă și se clasifică în trei categorii: calculi de colesterol (predominați), calculi pigmentari și micști. Calculii de tip colesterol conțin peste 70% colesterol iar cei pigmentați conțin majoritar săruri biliare și sub 20% colesterol. Componentul majoritar al calculilor maro este palmitatul de calciu iar cel al calculilor negri este fosfatul de calciu asociat cu carbonat de calciu. Apariția **calculilor de colesterol** este favorizată în principal de: a) Ponderea majoră a colesterolului în raport cu lecitina și sărurile biliare; b) Concentrația bilei, staza veziculară; c) Hipomotilitatea veziculei biliare cu stază consecutivă (pacienții de la terapie intensivă cu alimentație parenterală, după administrarea de anticoncepționale orale, sarcină). Obezitatea, terapia cu cloribrat, genul feminin, dietele hipercalorice, fibroza chistică asociată cu insuficiență pancreatică, cresc riscul de apariție a calculilor de colesterol. **Calculii pigmentari** pot fi: a) de culoare brună (apar după infecții bacteriene), fiind asociați cu diverticuli duodenali

periampulari și tind să se formeze în ductele biliare; b) de culoare neagră - la pacienții cu anemii hemolitice cronice, ciroză alcoolică, vârsta înaintată și tind să se formeze în vezica biliară.

Calculii salivari (litiata salivară, calculi ai ductelor salivare, sialolitiata) apar în interiorul glandei salivare sau a unui duct salivar, blochează fluxul salivar spre cavitatea bucală. Deseori calculii salivari afectează glandele submandibulare. Principalii factori favorizanți ai apariției calculilor salivari sunt: obiceiuri alimentare nesănătoase, deshidratare, unele tratamente medicamentoase (antihipertensive, antihistamine, medicamente pentru incontinența urinară), traume la nivelul glandelor salivare, ce au ca rezultat reducerea fluxului de salivă/îngroșarea acesteia și favorizând depunerea și cristalizarea substanțelor care intră în alcătuirea salivei (predominant Ca^{2+}). Calculii din canale au formă alungită iar cei intraglandulari sunt rotunjiți. Suprafața este în general rugoasă, neregulată, brăzdată de canale longitudinale prin care se scurge saliva. Culoarea este albă-cenușie, brună (în prezența sângelui), gălbuie sau roșietică. Din punct de vedere chimic, calculilor salivari conțin aproximativ 90% substanțe minerale (majoritar fosfați de calciu, carbonați de calciu, rodanat de potasiu, Cl^- , Mg^{2+} , Fe^{2+} , etc) și 10% substanțe organice în 10% (epitelii descumate, mucină, micelii actinomicotice, etc) (Laborator Regina Maria (b)).

Reacții de identificare a componentelor din calculii urinari

Principiul lucrării

Identificarea naturii compușilor care apar în calculii urinari se bazează pe reacții de culoare între componentii calculilor și reactivi specifici (Albu, 2001, Viman și Mihai, 1994).

Aparatură și reactivi

- Calculi urinari
- HCl 2N
- HNO_3 concentrat ($d = 1,42 \text{ g/mL}$)
- Soluție molibdat de amoniu 5%
- Soluție NaOH 10%
- Soluție saturată $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$
- Soluție de NH_3 25%
- Cloroform
- Soluție de H_2SO_4 concentrat ($d = 1,92 \text{ g/mL}$)
- Anhidridă acetică

- Soluție de KMnO_4 1%
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

1) Identificarea CO_3^{2-} : dacă apare efervescentă la dizolvarea pulberii de calcul urinar în HCl 2N la cald.

2) Identificarea PO_4^{3-} : peste pulberea de calcul se adaugă câteva 1-2 mL soluție de molibdat de amoniu și câteva picături de soluție 5% de HNO_3 concentrat ($d = 1,42 \text{ g/mL}$), se încălzește. Colorația galbenă sau precipitat galben (fosfomolibdat de amoniu) formată la răcire indică prezența PO_4^{3-} .

3) Identificarea ionului oxalat (COO) $_2^{2-}$: pulberea de calcul se amestecă cu 2 picături KMnO_4 1% și 1 mL H_2SO_4 5%. Dacă prin încălzirea eprubetei se produce decolorarea soluției se demonstrează prezența ionului oxalat (se reduce KMnO_4 producând decolorarea soluției).

4) Identificarea cistinei: pulberea de calcul se amestecă cu 2-3 picături soluție de $\text{Pb}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ saturată și 1 mL soluție de NaOH 10%, se fierb 1-2 minute. În prezența cistinei se formează un precipitat negru (PbS).

5) Identificarea uratului (reacția murexidului): pulbere de calcul urinar se umezește cu 2-3 picături HNO_3 concentrat ($d = 1,42 \text{ g/mL}$) și se evaporă pe flacără la sec. Formarea culorii roșii indică formarea acidului purpuric (oxidarea acidului uric de către HNO_3). Prin adăugarea unei picături de soluție de NH_3 25% și a unei picături de soluție de NaOH 10% se formează culoarea violet (formarea purpuratului de amoniu).

6) Identificarea xantinei: se efectuează reacția cu HNO_3 concentrat (similar evidențierii uratului). În prezența xantinei apare un reziduu galben care nu își schimbă culoarea prin adăugare de soluție de NaOH . Prin adăugare de soluție de NH_3 culoarea virează la roșu.

7) Identificarea colesterolului (reacția Liebermann-Burchardt): se amestecă pulbere de calcul urinar, 4 picături H_2SO_4 concentrat ($d = 1,92 \text{ g/mL}$), 1 mL cloroform și 2 picături anhidridă acetică. În prezența colesterolului se formează dicolestendiena (culoare variată de la roz la verde), extractabilă în cloroform.

Aplicarea metodei FTIR în caracterizarea calculilor biliari

Principiul metodei

Metoda FTIR permite o analiză rapidă a compoziției calculilor biliari prin identificarea benzilor de absorbție specifice componentilor de bază din structura acestora.

Reactivi si echipamente

- Calculi biliari
- KI spectral
- Spectrometru FTIR
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

A. Pregătirea calculilor biliari

Calculii biliari se spală cu apă deionizată pentru îndepărtarea aderențelor și bilei, se usucă la 60°C timp de patru ore, se mojarază foarte fin și se pregătesc pastile cu KI.

B. Înregistrarea spectrelor FTIR

Se înregistrează spectrele FTIR pe domeniul 4000 cm^{-1} – 400 cm^{-1} .

Rezultate experimentale

Se interpretează spectrele FTIR obținute urmărind benzile de absorbție caracteristice indicate în literatura de specialitate (Tabelul 9.2).

Tabelul 9.2. Benzile de absorbție ale compușilor întâlniți în calculii biliari

Compoziție	Benzile de absorbție specifice unor tipuri diferite de calculi biliari, cm^{-1} (Raman și Selvaraju, 2008)			Benzile de absorbție obținute pentru calculii analizați		
	Micști	Negri	Maro	Micști	Negri	Maro
Colesterol	3402, 2933, 901, 2867, 1466, 459, 1376, 1365, 1333, 1056	3393, 2932, 1052	2929, 2866, 1052			
Bilirubină și componentii ei	3421, 3032, 272, 1169, 986	3421, 992	3398, 1629, 991			
Palmitat de calciu	2849, 1412	2850, 1577	2849, 1830, 1700			
Oxalat de calciu	3446	-	-			
Amide I	1649	1654	1647			
Amide II	1543	1247	-			
Carbonat de calciu	1448, 840	1446	1447			
CaCO ₃ calcit	1438	-	-			
CaCO ₃ aragonit	1082, 699	875, 698	698			
CaCO ₃ vaterit	741	-	-			
Oxalat de calciu monohidrat	882	-	-			

Apatita	1236	-	-			
Fosfat	957, 605, 593	1105, 606	1248			

Coeficientul de absorbantă K se va calcula conform relației:

$$K, \text{ cm}^2/\text{g} = \frac{\text{Abs} \cdot A}{m} \quad (9.1)$$

unde:

Abs – absorbanta picului caracteristic de absorbtie

A – suprafata pastilei supusa analizei FTIR, cm²

m – masa pastilei, g

Valorile coeficientilor de absorbantă obtinuti pentru calculii biliari analizați se trec în Tabelul 9.3.

Tabelul 9.3. Valorile coeficientilor de absorbantă asociati calculilor biliari analizați

Tip de calcul biliari	Coeficient de absorbantă K, cm ² /g			
	K ₃₄₂₁	K ₂₈₄₉	K ₂₉₃₂	K ₁₄₄₈
Micsti				
Maro				
Negri				

Plecând de la benzile de absorbtie și valorile coeficientilor de absorbantă se caracterizează compoziția calculilor biliari analizați.

10. LICHIDUL SINOVIAL

Aspecte generale

Lichidul sinovial (lichidul articular) este un lichid vâscos, steril, care se găsește în cavitățile articulare având rol alături de articulații de a atenua șocurile, de a reduce frecarea dinte tendoane și oase, împiedicând uzura oaselor și deteriorarea ligamentelor și cartilajelor.

Din punct de vedere chimic, lichidul sinovial are aceeași componenți ca și plasma sanguină și în aceeași concentrație, cu excepția unei cantități mai ridicate de proteine și a mucopolizaharidelor cu masă coleculară mare denumite acid hialuronic (Ridley, 2018).

Analiza lichidului sinovial include verificarea proprietăților fizice, determinare numărului de celule albe, identificarea cristalelor și analiza chimică de bază.

Caracteristicile lichidului sinovial normal sunt prezentate în Tabelul 10.1.

Tabelul 10.1. Caracteristicile normale ale lichidului sinovial (Ridley, 2018):

Parametrul	Intervale de referință
Număr celule albe	< 150/mL
Celule albe-neutrofile	<25%
Limfocite	<75%
Monocite	<70%
Glucoză (nivelul în sânge mai mic decât în lichidul sinovial)	< 10 mg/dL
Proteine	<10 mg/dL

Caracterizarea fizică

Volumul

Cantitatea de lichid sinovial este relative redusă, aproximativ 4-5 mL.

Culoarea și claritatea

Fluidul sinovial normal este incolor și clar. Modificări ale culorii indică existența unor afecțiuni:

- culoarea galbenă, dar cu menținerea clarității sunt tipice efuziunilor non-inflamatorii
- culoarea galbenă acompaniată de turbiditate indică afecțiuni inflamatorii
- culoarea albă asociată cu turbiditate indică existența cristalelor

- culorile roșii, maro sau pigmenți roz sau galben indică hemoragii în interiorul articulației
- existența corpurilor în suspensie: fibrină (specifică artritei reumatoide), bucăți de plastic sau metalice de la implanturi

Vâscozitatea

În condiții normale, lichidul sinovial este clar, de culoare alb-gălbuie și vâscos. Unul dintre testele de verificare a vâscozității se poate efectua exact după colectarea lichidului sinovial cu ajutorul unei seringi. Picătura lăsată să curgă la capătul acului seringii trebuie să se întindă pe o lungime de 10 cm. Ruperea acestuia la o lungime mai mică de 5 cm indică o vâscozitate redusă, respectiv o cantitate mai mică de acid hialuronic ca rezultat al lizării acestuia de către enzimele eliberate din celulele inflamatorii. O cauză posibilă poate fi o infecție bacteriană care conduce la producerea unor enzime cu rol în lizarea acidului hialuronic (Ridley și colab., 2018).

Coagularea

Coagularea lichidului sinovial indică existența fibrinogenului care poate ajunge în urma deteriorării membranei sinoviale. Prezența cheagurilor interferă în analiza lichidului sinovial, în special în analiza microbiologică. Din acest motiv se recomandă recoltarea în vacutainere care conțin anticoagulanți, de preferință heparină.

Testul mucinelor (Testul Rope)

Este o metodă prin care se face estimarea integrității/calității acidului hialuronic. Metoda are la bază reacția dintre mucinele prezente în lichidul sinovial și acidul acetic cu formarea unui cheag dintre acidul hialuronic și acidul acetic. Concentrațiile acidului acetic folosit și raportul lichid sinovial: acid acetic pot fi diferite (Tabelul 10.2), dar interpretarea rezultatului este similară: în cazul unui lichid sinovial normal cheagul trebuie să se formeze rapid, să fie ferm, iar lichidul să fie limpede. Formarea unui cheag friabil indică un acid hialuronic distrus sau diluat, respectiv o inflamație articulară.

Tabelul 10.2. Raportul lichid sinovial:acid acetic la efectuarea Testului Rope (cf. Mundt, 2016)

Volumul de lichid sinovial	Volumul și Concentrația acidului acetic	Sursa bibliografică
O parte	Patru părți, 2%	Brunzel, 2004
O parte	Patru părți, 2%	Ross și colab., 1983
Două părți	O parte, 3%	McBride, 1998
Nespecificată		Strasinger și colab., 2008

Analiza chimică

Analiza chimică urmărește determinarea concentrațiilor parametrilor indicați în Tabelul 10.3. Dozarea componentilor chimici în lichidul sinovial se face similar cu tehnicile aplicate pentru dozarea aceluiași componente în ser.

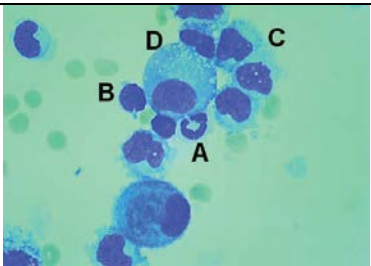
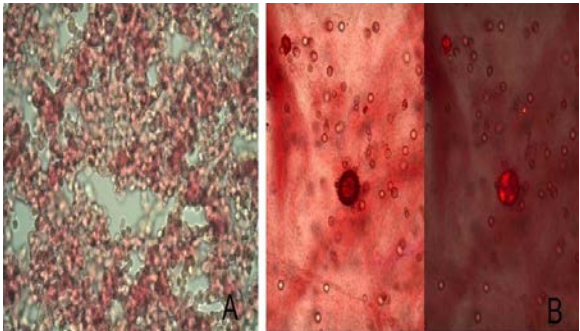
Tabelul 10.3. Parametrii considerați în analiza chimică a lichidului sinovial (Ridley, 2018; Mundt, 2016)

Parametrul	Interpretarea rezultatelor
Glucoza	Se găsește în concentrație ușor mai redusă decât în plasmă, de aproximativ 10 mg/dL. În cazul traumatismelor, concentrația glucozei este foarte scăzută comparativ cu cea din sânge ca urmare a prezenței bacteriilor care o pot folosi ca sursă de hrană.
Proteine	Lichidul sinovial conține toate proteinele care se găsesc în plasmă, cu excepția câtorva proteine cu masă moleculară mare (fibrinogen, beta 2-macroglobuline, alfa 2-macroglobuline) care fie lipsesc, fie se găsesc în cantități extrem de reduse. Conținutul proteic normal este cuprins în intervalul 1-3 g/dL, și va fi ridicat în cazul prezențelor bacteriene și probabil mai redus în cazul infecțiilor virale
Acid lactic	Conținutul de acid lactic în lichidul sinovial este < 25 mg/dL. Valori ridicate (1000 mg/dL) apar în artritele septice
Lactat dehidrogenaza	Niveluri ridicate apar în cazul pacienților suferind de artrită reumatoidă, artrită infecțioasă sau gută și se datorează numărului mare de neutrofile
Acid uric	Nivelul normal al acidului uric este în intervalul 6-8 mg/dL. Nivelul de acid uric apare ridicat atât în plasma sanguină și lichidul sinovial în cazul gutei
Factorul reumatoid	Este un anticorp al imunoglobulinelor, prezent în serul persoanelor cu artrită reumatoidă. Este posibil ca acest anticorp să fie produs doar de țesutul articular și să apară cu valoare ridicată în lichidul sinovial, în timp ce nivelul acestuia în ser să fie în limite normale

Analiza microbiologică

Cuantificarea celulelor prezente în lichidul sinovial ar trebui să se facă în maxim 1 oră de la recoltare, folosind ca diluanți o soluție salină hipotonică, un acid slab sau diluant sau diluanți specifici disponibili comercial. Frotiul se colorează cu agent de fixare pentru a conserva morfologia celulelor. În cazul în care o probă de lichid sinovial este extrem de vâscoasă și nu poate fi dispersată pe suprafața lamelei se adaugă o enzimă denumită hialuronidază (factor de dispersie) cu rol de lizare a acidului hialuronic din probă. Tipurile de celule care se găsesc în lichidul sinovial normal sunt indicate în Tabelul 10.4.

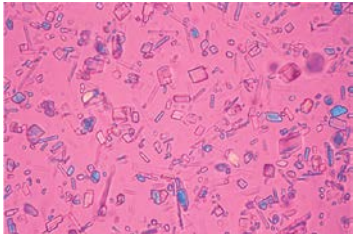
Tabelul 10.4. Celule care pot găsite în lichidul sinovial

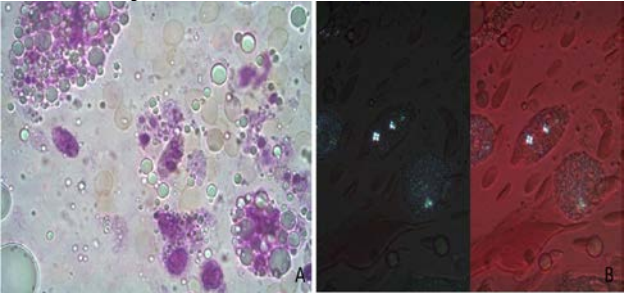
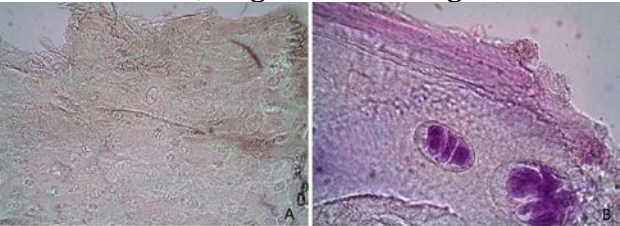
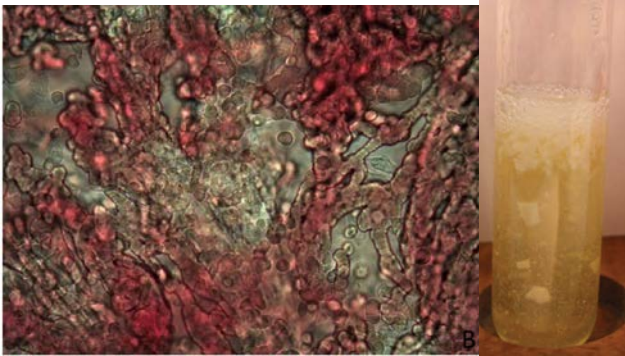
Celule	Caracteristici
Celule normale	
 <p>A – neutrofile, B – limfocite, C – monocite, D – celule sinoviale (Mundt, 2016 (From McClatchey KD. Clinical Laboratory Medicine. 2nd Ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2002))</p>	<p>Celulele albe se găsesc în intervalul 0 – 150 celule/μL. Dintre acestea neutrofilele sunt 7%, limfocitele 24%, monocitele 48%, macrofagele 10% și celulele sinoviale 4% (nu au semnificație clinică). Prezența alto tipuri de celule sau a unui număr mai ridicat indică existența unei afecțiuni.</p> <p>Ex: eozinofilele într-o pondere mai mare de 2% asociază alergiile cu artritele, efuziuni hemoragice, boala Lyme, artrite parazitare și tuberculare, boli reumatoide.</p>
Celule anormale	
<p>Hematii</p>  <p>(Oliviero și colab., 2017)</p>	<p>Vizibile în colorație de roșu alizarină Lichidul sinovial normal nu conține eritrocite. Prezența lor este legată de efuziune hemoragică, traumatisme ale articulației sau deteriorarea membranei sinoviale</p>

Analiza microscopică

Analiza microscopică a lichidului sinovial pentru identificarea tipurilor de cristale este o analiză de rutină în laboratoarele medicale (Tabelul 10.5).

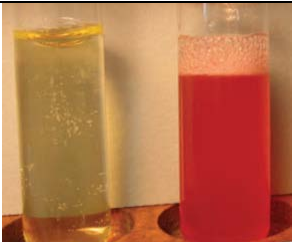
Tabelul 10.5. Cristalele comune în lichidul sinovial (Ridley, 2018; Mundt, 2016)

Cristalul	Caracteristici
<p>Pirofosfat de calciu dihidratat ($\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)</p>  <p>(Dieppe și colab., 1999)</p>	<p>Apare sub forma unor paralelograme romboidale la care laturile adiacente sunt de lungime inegală și unghiurile sunt oblice. Afectează cel mai frecvent articulația genunchiului</p> <p>Unele boli (hipotiroidismul, hiperparatiroidismul sau hemacromatoza) pot determina formarea depozitelor de CPPD deoarece glandele paratiroide pot favoriza apariția hipercalcemiei în sânge prin producerea parathormonul (PTH)</p>
<p>Cristale de colesterol</p>	<p>Plate, clare, rombice dar cu un colț retezat, au tendință de agregare. Apar la pacienții cu artrite vechi</p>
<p>Monourat sodic</p>	<p>Au formă aciculară Apar în guta acută</p>

<p>Hidroxiapatită</p>	<p>Cristale sub formă de depozite, foarte mici și nu pot fi vizualizate cu polarizare Pot fi identificate în colorație roșie-alizarin Apar în guta apatitică</p>
<p>Cristale lipidice</p>  <p>(Oliviero și colab., 2017)</p>	<p>Apar sub formă de bilă iar vizualizate în lumină polarizată apare crucea de Malta Apar în artrita acută</p>
<p>Oxalat de calciu</p>	<p>Bastonaș, sau tetraedru</p>
<p>Cristale străine: collagen, fibrină, fragmente metalice din încheieturile protetice, corticosteroizi, fragmente cartilajinoase</p>  <p>Fragmente de cartilaj (Oliviero și colab., 2017)</p>  <p>Fibrină (Oliviero și colab., 2017)</p>	<p>-</p>

Pe baza caracteristicilor sale fizice, microbiologice și microscopice, pot exista șase tipuri de lichid sinovial ale căror caracteristici sunt indicate în Tabelul 10.6.

Tabelul 10.6. Caracteristicile normale ale lichidului sinovial (Mundt, 2016):

Tip	Aspect	Vâscozitate	Cheagul de mucine	Celule albe Neutrofile	Glucoză Sânge:Lichid sinovial	Alte caracteristici
Normal	Incolor Galben-pai	Ridicată	Ferm	< 150 < 25%	0-10	 <p>Figura 10.1. Fluid sinovial normal și hemoragic</p>
Neinflamat	Galben Ușor turbure	Scăzută	Medie	< -1.000 <30%	0-10	-
Inflamat	Alb, gri, galben, verde Turbure	Absentă	Slab	< -100.000 <50%	0-4	-
Septic	Alb, gri, galben, verde Turbure, purulent	Absentă	Slab	50.000-200.000 >90%	20-100	Pozitiv la culturi
Indus de cristale	Alb, turbure, lăptos, opac	Absentă	Slab	500 – 200.000 <90%	0 - 80	Prezente cristale
Hemoragic	Sanguinos, xantocromic (pigmenți roz sau galbeni), roșu, maro, Turbure	Absentă	Slab	50 – 1200.000 <50%	0 - 20	Prezente eritrocite provenite din fracturi sau tumori ale articulațiilor sau oaselor. Poate apărea și la persoanele care sunt sub tratament cu anticoagulante pentru combaterea formării cheagurilor sanguine sau prevenirea problemelor cardiace ca rezultat al efuziunii sângelui.

11. DETERMINAREA BIODISPONIBILITĂȚII NUTRIENȚILOR DIN ALIMENTE PRIN DIGESTIE *IN VITRO*.

STUDIU DE CAZ: DETERMINAREA BIODISPONIBILITĂȚII ELEMENTELOR MINERALE

Principiul lucrării

Lucrarea își propune să pună în evidență gradul de biodisponibilitate a nutrienților din alimente. În acest sens, alimentul este metabolizat prin parcurgerea etapelor de digestie orală, gastrică și intestinală *in vitro*, în prezența simulanților de salivă, suc gastric și suc intestinal. Odată alimentul metabolizat prin parcurgerea unei anumite etape, se pot preleva probe care vor putea fi analizate pentru determinarea concentrațiilor nutrienților (elemente minerale, grăsimi, proteine, polifenoli, etc).

Aparatură și reactiv

- KCl
- KH_2PO_4
- NaHCO_3
- NaCl
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
- $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$
- HCl
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
- Amilază salivară
- Pepsină
- Lipază gastrică
- Săruri biliare
- Tripsină (pancreatină)
- Spectrometru de absorbție atomică AAS
- Baie de apă, centrifugă, agitator cu termostatare
- Sticlărie de laborator

Folosind reactivii menționați mai sus, se prepară soluții stoc cu ajutorul cărora se obțin

simulanții de salivă, suc gastric și suc intestinal conform indicațiilor din Tabelul 11.1 (Brodkorb și colab., 2019).

În Tabelul 11.2. sunt prezentate cantitățile de reactivi și enzime necesare pentru digestia *in vitro* a 5 g de aliment cf. protocolului INFODIGEST.

Tabelul 11.1. Prepararea simulanților de salivă, suc gastric și suc intestinal

Substanța	Concentrația soluției stoc, g/L	Simulant salivă (SS, pH = 7)	Simulant suc gastric (SSG, pH = 3)	Simulant suc intestinal (SSI, pH = 7)
		Volumul de soluție adăugat pentru a obține un volum de 400 mL SS, mL	Volumul de soluție adăugat pentru a obține un volum de 400 mL SSG, mL	Volumul de soluție adăugat pentru a obține un volum de 400 mL SSI, mL
Reactivi				
KCl	37.3	15.1	6.9	6.8
KH ₂ PO ₄	68	3.7	0.9	0.8
NaHCO ₃	84	6.8	12.5	42.5
NaCl	117	-	11.8	9.6
MgCl ₂ *6H ₂ O	30.5	0.5	0.4	1.1
(NH ₄) ₂ CO ₃	48	0.06	0.5	-
HCl	-	1.1	1.3	0.7
CaCl ₂ *2H ₂ O*	44.1	0.025	0.005	0.04
Enzime digestive				
Alfa amilaza	10 mg/mL			
Pepsina	20 mg/mL			
Lipaza gastrica	100 mg/mL			
Saruri biliare	200 mg/mL			
Tripsina (pancreatina)	133.3 mL			

* CaCl₂*2H₂O* se adauga doar inainte de utilizarea pt. a nu precipita

Tabelul 11.2. Cantitățile necesare pentru digestia a 5 g aliment

Componentul	Digestia orală	Digestia gastrică		Digestia intestinală	
Alimentul/Digesta	5 g aliment	10 mL bol din faza orală		20 mL chim din faza gastrică	
Soluție stoc de simulant, mL	4 mL SS	8 mL SSG		8 mL SSI	
CaCl ₂ *2H ₂ O, mL	0.025	0.005		0.04	
Enzime gastrice, săruri biliare	Amilază salivară	Pepsină	Lipază gastrică	Trypsină în pancreatină	Săruri biliare
Activitatea enzimei (U/mL) sau concentrația bilei (mM) în digesta	75 U/mL	2.000 U/mL	60 U/mL	100 U/mL	10 mM
Activitatea specifică (U/mg), concentrația bilei (mmol/g)	100 U/mg	3.000 U/mg	25 U/mg	6 U/mg	0.667 mmol/g
Concentrația sol. de enzimă/bilă, (mg/mL)	10	20	100	133.33	200
Volumul de enzimă/bilă adăugat	0.75	0.667	0.48	5	3
H ₂ O (mL)	0.225	0.448		3.16	
HCl (5 M) pt. ajustare pH (mL)	-	0.4		-	
NaOH (5M) pt. ajustare pH (mL)	-	-		0.8	
Volumul final	10	20		40	

Modul de lucru

A. Digestia *in vitro*:

A1. Digestia orală:

1. Se preîncălzește SS la 37°C pe baia de apă
2. 5 g de aliment se amestecă cu 4 mL SS până la atingerea unei consistențe păstoase similare muștarului sau pastei de tomate (dacă este mai groasă se adaugă apă, dar fără a se depăși 0.225 mL). Pentru a simula masticăția, se poate folosi un blender. Volumul final aliment+SS trebuie să fie 10 mL
3. Se adaugă V = 0.025 mL CaCl₂*2H₂O
4. Se adaugă V = 0.225 mL apă (dacă nu s-a adăugat pt. diluția bolului inițial)
5. Se adaugă V = 0.75 mL amilază salivară
6. Se incubează amestecul timp de 2 minute la 37°C.

A2. Digestia gastrică (2 h)

1. Se preîncălzește SSG la 37°C pe baia de apă
2. 10 mL bol alimentar rezultat de la digestia orală se amesteca cu 8 mL SSG
3. Se ajustează pH-ul la 3 prin adăugarea unui volum cunoscut de HCl
4. Se adaugă $V = 0.005$ mL soluție de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
5. Se adaugă $V = 0.667$ mL pepsină (din bilă porcină)
6. Se adaugă 0.667 mL = 0.48 mL lipază gastrică
7. pH-ul se ajustează la 3 dacă este necesar ($V = 0.4$ mL HCl)
8. Se adaugă $V = 0.448$ mL
9. Se incubează la 37°C sub agitare timp de 2 ore din momentul adăugării pepsinei

A3. Digestia intestinală (2 h)

1. Se preîncălzește SSI la 37°C pe baia de apă
2. Se amestecă 20 mL chim gastric cu 8 mL SSI
3. Se ajustează pH la 7 prin adăugare de NaOH ($V = 0.8$ mL NaOH)
4. Se adaugă $V = 3$ mL soluție de săruri biliare și se omogenizează 30 minute la 37°C
5. Se adaugă $V = 0.04$ mL soluție $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
6. Se adaugă $V = 5$ mL soluție de pancreatină
7. pH-ul se ajustează la 7 dacă este necesar
8. Se adaugă 3.16 mL H_2O
9. Se incubează sub agitare la 37°C timp de 2 ore din momentul adăugării enzimei pancreatice

B. Determinarea biodisponibilității elementelor minerale și proteinelor

Din amestecurile rezultate în urma parcurgerii etapelor de digestie se pot preleva probe care se supun centrifugării la 6500 rot/min. timp de 30 minute. Supernatantul se colectează, se aduce în balon cotat de 50 mL și se citește conținutul de elemente minerale prin spectrometrie de absorbție atomică).

Rezultate experimentale

Biodisponibilitatea elementelor minerale se discută din două puncte de vedere:

1. Concentrația fiecărui element mineral în faza lichidă a fiecărei etape a digestiei
2. Biodisponibilitatea fiecărui element mineral, calculată ca raportul dintre concentrația elementului într-o anumită etapă a digestiei și concentrația elementului mineral în proba de

aliment nesupusă digestiei.

Observații

1. Pentru a putea exclude contribuția elementelor minerale aduse de reactivii folosiți la prepararea simulanților, se efectuează digestii fără probe de alimente; alimentul va fi înlocuit cu o cantitate de apă echivalentă umidității alimentului analizat;

2. Se determină concentrația elementelor minerale și în proba de aliment nesupusă digestiei.

12. ELECTROFOREZA

Aspecte generale

Electroforeza este o tehnică de separare bazată pe migrarea ionilor dintr-o soluție sub influența unui camp electric. Astfel, ionii negativi (anionii) migrează spre polul pozitiv (anod) iar ionii pozitivi (cationii) migrează spre polul negativ (catod).

Electroforeza pe hârtie

Metoda are la bază utilizarea hârtiei ca suport pentru migrarea biomoleculilor. Tehnica este intens folosită pentru separarea aminoacizilor/proteinelor, deoarece acestea conțin grefate pe catenă grupări ionizabile. Aminoacizii în care gradul de ionizare al grupărilor $-NH_2$ este mai mare decât cel al grupărilor $-COO^-$ vor avea pe ansamblu sarcină pozitivă și vor migra spre catod, iar cei în care puterea grupărilor $-COO^-$ este mai mare vor fi polarizați negativ și vor migra spre anod.

Electroforeza pe hârtie a proteinelor serice (Briciu, 2010)

Principiul metodei

Metoda are la bază utilizarea hârtiei ca suport pentru migrarea proteinelor serice. În structura serului există două mari clase de proteine: albumina și globulinele.

Albumina este proteina majoritară în ser.

Globulinele se clasifică în următoarele fracții:

- globuline- α_1 – conține α_1 -antitripsina, și lipoproteine
- globuline- α_2 – conține ceruloplasmina, haptoglobina, lipoproteine (HDL), α_2 - macroglobuline
- β -globuline – conține lipoproteine LDL, transferină, hemopexină, sistemul complement
- γ – globuline – imunoglobuline, fibrinogen, proteina-C reactivă

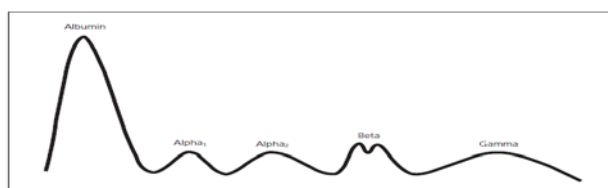


Figura 12.1. Frațiile proteinelor serice

Tabelul 12.1. Caracteristici ale proteinelor serice

Fracțiune proteică	Greutate moleculară, Da	Punctul izoelectric (pH-ul la care are loc precipitarea)	Pondere normală, %	Concentrația în ser g/L
Albumina	66.430	4,8	52-62	36-49
α_1 globuline	130.000	5,0	3-5	6-11
α_2 globuline	200.000	5,0	6-9	
β globuline	1.300.000	5,12	9-14	5-10
γ globuline	150.000	6,8-7,3	11-17	7-16

Cu excepția γ -globulinelor, celelalte proteine serice sunt încărcate cu sarcină electrică negativă și vor migra spre anod (polul pozitiv). Banda cea mai apropiată de anod va fi cea a albuminei, urmată de α_1 -globuline, α_2 -globuline și β -globuline. Frațiunea γ -globulinelor este neutră dar migrează puțin spre catod datorită fenomenului denumit endosmoză (migrarea unei specii sub acțiunea unei diferențe de potențial).

Reactivi și echipamente

Ser sanguin: se recoltează sânge venos *à jeun* în vacutainer fără anticoagulant cu/fără gel separator și se separă serul prin centrifugare. Se respinge specimenul intens hemolizat, lipemic sau contaminat bacterian.

Acid boric – solid

Tris bază – solid

Na₂EDTA - solid

Soluții de aminoacizi 1%

Soluție de KH₂PO₄ : 9,8 g sare la 1000 mL apă distilată

Soluție Na₂HPO₄ : 9,47 g sare la 1000 mL apă distilată

Soluție tampon cu pH 6 (pt. aminoacizi): 87,7 mL soluție de KH₂PO₄ + 12,3 mL soluție de Na₂HPO₄

Tris-boric acid-EDTA pH 8.6 (pt. proteinele plasmatice): în 900 mL apă distilată se dizolvă 108 g Tris bază, 55 g acid boric, 9.3 g Na₂EDTA și se omogenizează. Se aduce cu apă distilată la volum de 1 L

Soluție de colorare pentru proteine se obține amestecând:

- 0,042% (g/V) albastru de bromofenol

- 2,5% mediu Ficoll (sau glicerol): mediul Ficoll este un polimer cu masă moleculară ridicată al cărui rol este de a adăuga vâscozitate colorantului, ajutând la colorarea probei

- 0,42% (W/V) Xilen cianol FF (opțional): colorant alternativ cu rol de urmărire; se poate adăuga la amestecul de colorant de încărcare permițând vizualizarea migrării colorantului

- apă distilată pentru a atinge volumul de soluție de colorare dorit

Acid acetic 5%

Soluție de eluare: NaOH N/100

Instalație de electroforeză

Hârtie de filtru

Spectrofotometru UV-VIS

Sticlărie de laborator: pahare, pipete, vârfuri, tuburi Ependorf

Balanță analitică

Echipment individual de protecție: halat, ochelari, mănuși, măști

Mod de lucru

1. Metoda cu colorarea probelor după electroforeză

1. Pregătirea benzii de hârtie de filtru: se pregătesc 3 benzi de hartie de filtru cu dimensiunile 30 x 2 cm care se fixează în cuva aparatului de electroforeză. Benzile trebuie să fie întinse, cu o distanță de 1-2 cm între ele

2. Se montează pieptenele roșu la marginea benzii de hartie și se marchează cu un creion zonele în care se va picura serul sanguin – linia de start

3. Se alimentează cuva cu soluția tampon având grijă să umecteze hartiile de filtru și să nu existe aer sub acestea

4. Se efectuează timp de 20-30 minute pre-electroforeza în soluția tampon la 300 V, 8 mA și 150 W.

5. După terminarea pre-electroforezei se picură un volum cunoscut (30 μ L) de ser plasmatic pe semnele facute pe benzile de hartie de filtru (după o prelabilă tamponare a zonei cu hartie absorbantă pentru a reduce dispersia prin difuzie) și se pornește electroforeza timp de 4-5 ore (separare rapidă) sau 16-18 ore (separare lentă) la aceiași parametrii folosiți la pre-electroforeză. Separarea lentă este de preferat pentru obținerea de proteinograme cu dispersie largă a fracțiunilor.

6. La finalizarea electroforezei, benzile de hartie se colorează prin aplicarea colorantului (se păstrează colorantul pe benzi cel puțin 30 minute).

7. Se spală benzile de hartie colorate cu soluție de acid acetic 5% pentru îndepărtarea excesului de colorant până când apa de spălare rămâne limpede

8. Se usucă benzile de colorate în etuvă, la 100°C timp de 10-15 minute

2. Metoda cu colorarea probelor înainte de electroforeză

Pentru evidențierea migrării proteinelor se pot folosi benzi albe de hârtie de filtru pe care se formează un amestec format din 0,3 mL ser și 0,3 mL soluție de colorare pentru proteinele plasmatică. După terminarea pre-electroforezei, amestecul se picură pe banda de hartie la semn, se adaugă soluția tampon și se pornește electroforeza timp de 4-5 ore (electroforeza rapidă) sau 16-18 ore (electroforeza lentă).

În cazul aminoacizilor, amestecul se formează din 0,3 mL soluție aminoacid și câteva cristale de albastru de bromfenol (sau 0,3 mL soluție de albastru bromfenol 1%).

După terminarea pre-electroforezei, amestecul se picură pe banda de hartie la semn și se pornește electroforeza timp de 4-5 ore (electroforeza lentă) sau 16-18 ore (electroforeza rapidă).

Analiza cantitativă a fracțiunilor proteice

Din benzile de hartie (proteinograma) se decupează zonele care conțin fracțiunile proteice (banda albuminei fiind cea mai apropiată de anod), se mărunțește fiecare bandă, se introduc în eprubete, se adaugă câte 6 mL soluție NaOH N/100 și se lasă la eluare aproximativ 30 minute. Extincția fiecărei fracțiuni se citește la 590 nm, în raport cu apa distilată.

Se calculează ponderea fiecărei fracțiuni conform relațiilor:

$$\text{albumina, \%} = \frac{E_1}{E_1 + E_2 + E_3 + E_4 + E_5} \cdot 100 \quad \alpha_1 \text{ globulina, \%} = \frac{E_2}{E_1 + E_2 + E_3 + E_4 + E_5} \cdot 100$$

(12.1)

$$\alpha_2 \text{ globulina, \%} = \frac{E_3}{E_1 + E_2 + E_3 + E_4 + E_5} \cdot 100 \quad \beta \text{ globulina, \%} = \frac{E_4}{E_1 + E_2 + E_3 + E_4 + E_5} \cdot 100$$

(12.2)

$$\gamma \text{ globulina, \%} = \frac{E_5}{E_1 + E_2 + E_3 + E_4 + E_5} \cdot 100$$

(12.3)

unde: E_1, E_2, E_3, E_4, E_5 – absorbanta fiecărei fracțiuni citită la spectrofotometru.

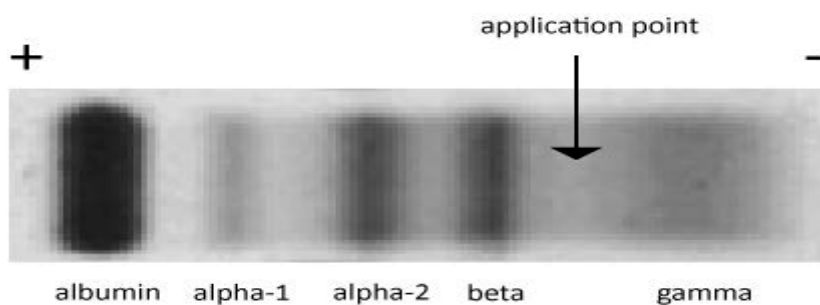


Figura 12.2. Migrarea proteinelor serice pe durata electroforezei pe hârtie
(<https://clsresource.com/index.php/serum-proteins/>)

Electroforeza pe gel de agaroză

Electroforeza proteinelor serice pe gel de agaroză

Reactivi și echipamente

Ser sanguin: se recoltează sânge venos *à jeun* în vacutainer fără anticoagulant cu/fără gel separator și se separă serul prin centrifugare. Se respinge specimenul intens hemolizat, lipemic sau contaminat bacterian.

Agaroză – puritate electroforetică

Albastru de bromfenol – pulbere

Glicerol

Soluție EDTA 0,5 M (pH 8.0): 186,1 g EDTA•2H₂O se omogenizează cu 800 mL apă distilată, se adaugă NaOH solid (aproximativ 20 g) până la pH 8 și se completează la 1 L cu apă distilată. După filtrare, soluția se autoclavează și se păstrează la frigider

Soluție stoc tampon TAE 10X (Tris-acetat EDTA 10X): 48,5 g Tris se amestecă cu 11,4 mL acid acetic glacial și 20 mL EDTA 0,5M (pH 8) (sau 3,7 g EDTA•2H₂O) și se aduce la 1 L cu apă distilată

Soluție tampon TAE 1X (Tris-acetat EDTA 1X): se diluează 1:10 soluție de TAE 10X (100 mL TAE 10X adus la semn în balon cotat de 1 L). Soluția rezultată va conține 0,4 M tris-acetat (pH aprox. 8.6) și 0,01 M EDTA

Soluție de colorare pentru proteine: se obține amestecând:

- 0,042% (g/V) albastru de bromfenol

- 2,5% mediu Ficoll (sau glicerol): Ficoll este un polimer cu masă moleculară ridicată crește vâscozitatea colorantului, ajutând la colorarea probei

- 0,42% (W/V) Xilen cianol FF (opțional): colorant alternativ cu rol de urmărire care se poate adăuga la amestecul de colorant de încărcare, permițând confirmarea vizuală a migrării colorantului

- apă distilată pentru a atinge volumul de soluție de colorare dorit

Soluție tampon pentru probe 4X (10 mL): se dizolvă 0,042 g albastru de bromfenol în 4 mL apă distilată, se adaugă 2 mL tampon TAE 1X și 4 ml glicerol

Soluție de fixare: pentru prepararea a 1 L soluție de fixare se amestecă etanol:acid acetic glacial:apă în proporțiile: 500:100:400 (v:v:v).

Soluție de decolorare: se amestecă metanol:acid acetic glacial:apă în proporțiile: 500:100:400 (v:v:v).

Marker proteine standard – se folosește pentru cuantificarea greutateilor moleculare ale fracțiunilor proteice din proba de analizat

Albumină serică bovină – se folosește pentru cuantificarea masei proteinelor în proba de analizat; se prepară soluții de concentrații cunoscute; se folosește de obicei un standard de 2 mg/mL din care se fac diluții succesive

Instalația de electroforeză

Cuptor cu microunde

Transluminator UV

Densitometru pentru analiza gelurilor sau programul ImageJ

Sticlărie de laborator: pahare, pipete, vârfuri, tuburi Ependorf

Bandă adezivă pentru sigilarea marginilor matriței înainte de turnarea soluției de agaroză

Balanță analitică

Echipment individual de protecție: halat de laborator, mănuși, măști, ochelari de protecție

Modul de lucru

Obținerea gelului de agaroză cu dimensiunea 10 cm x 10 cm x 1 cm (Figura 12.3)

Într-un pahar Erlenmayer se adaugă 1 g agaroză în 100 mL tampon de electroforeză TAE 1x și se solubilizează în cuptorul cu microunde până la obținerea unei soluții clare, transparente. Vasul în care se face dizolvarea agarozei trebuie să aibă un volum liber de cel puțin două ori mai mare comparativ cu volumul ocupat de lichid pentru a evita suprapresiunea indusă de acumularea vaporilor de apă rezultați la fierbere. Soluția se lasă să se răcească până la 55°C-60°C și se toarnă în matrița 10 cm x 10 cm amplasată pe o suprafață plană în care a fost fixat piaptănușul

pentru formarea godeurilor. Cu ajutorul unui vârf de pipetă se îndepărtează eventualele bule de aer formate la suprafața soluției turnate. După răcirea și întărirea gelului (aprox. 30 minute-1 oră la temperatura camerei) se scoate cu grijă piaptănul pentru a nu rupe godeurile și se așează matrița cu gel în cuva de electroforeză orizontală. În cuvă se toarnă soluție tampon de electroforeză TAE 1x (aceeași cu cea folosită la prepararea gelului), având grijă ca soluția să intre în godeuri și să acopere gelul cu un strat de lichid de aprox. 0,5 – 0,8 cm.

Obținerea gelului de agaroză cu dimensiunea 10 cm x 15 cm x 1cm

Se dizolvă 1,5 g agaroză în 150 cm³ mL tampon electroforeză TAE 1 X conform modului de lucru descris pentru gelul 10 cm x 10 cm x 1cm, iar soluția clară se toarnă în matrița 10 cm x 15 cm. După răcirea și întărirea gelului (aprox. 30 minute -1 oră la temperatura camerei) se scoate cu grijă piaptănul pentru a nu rupe godeurile și se așează matrița cu gel în cuva de electroforeză orizontală. În cuvă se toarnă soluție tampon de electroforeză TAE 1x (aceeași cu cea folosită la prepararea gelului), având grijă ca soluția să intre în godeuri și să acopere gelul cu un strat de lichid de aprox. 0,5 – 0,8 cm.

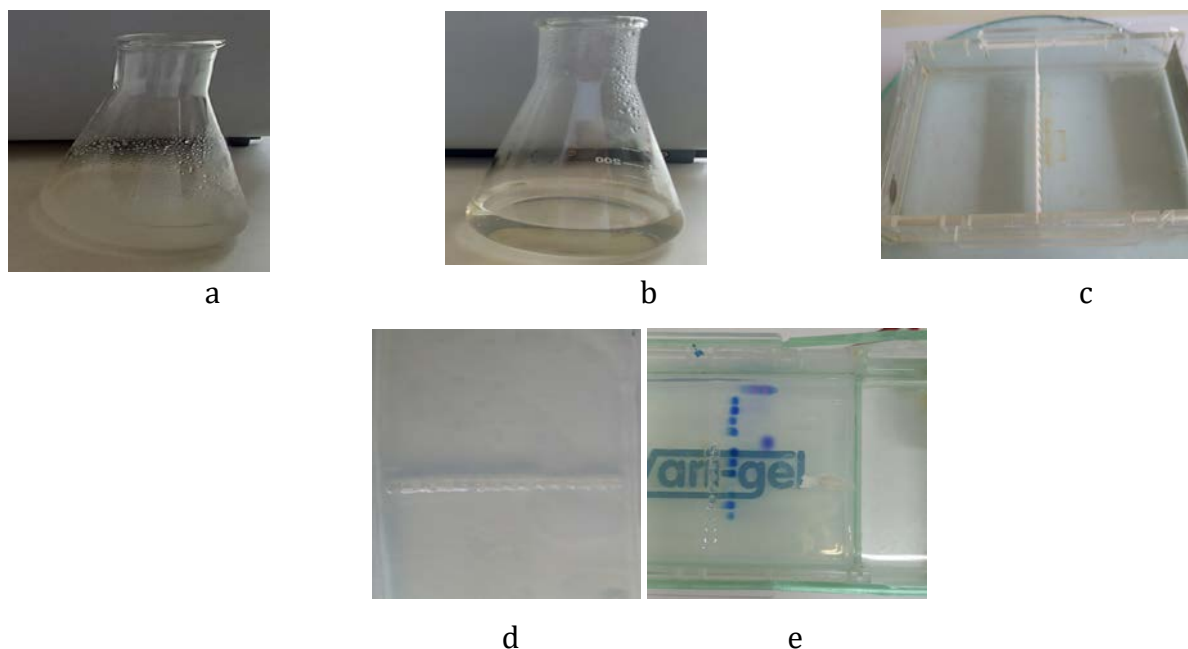


Figura 12.3. Pregătirea gelului de agaroză prin metoda de colorare a probelor înainte de electroforeză: a-soluție de agar înainte de fierbere; b – soluție de agar după fierbere; c – turnarea gelului de agar-agar; d – gelul de agar după gelifiere; e – introducerea gelului în cuva de electroforeză.

Pregătirea serului în vederea migrării în gel de agaroză

Într-un tub Eppendorf se amestecă 8 μL tampon pentru probe 4X și 26 μL soluție de analizat. 30 μL probă se încarcă în godeurilor din gel începând cu godeul nr. 2. În primul godeu se încarcă markerul proteine standard (volumul este indicat pe fișa tehnică). Godeurile se încarcă ținând eprubeta paralel cu șirul de godeuri, evitând inserarea vârfului pipetei până la baza godeurilor sau introducerea bulelor de aer. Pentru a evita încurcarea probelor, se poate marca pe matriță locul din care începe încărcarea.

Electroforeza

După încărcarea godeurilor cu marker și probă de analizat, se acoperă cuva de electroforeză și se conectează la o sursă de curent la o tensiune cuprinsă în intervalul 80 – 150 V (tensiuni mai ridicate pot intensifica migrarea dar, în același timp cresc efectul Joule care va avea ca rezultat topirea gelului de agaroză), 150 mA și se lasă să opereze timp de 30 minute - 2 ore (Figura 12.3.e), se oprește sursa de curent, se îndepărtează gelul .

Spălarea gelului

După finalizarea electroforezei, gelul se spală cu apă pentru îndepărtarea soluției tampon.

Fixarea proteinelor în gel

Gelul se introduce în soluția de fixare a proteinelor (3 ore).

Colorarea gelului

Se acoperă gelul cu soluția de colorare și se menține 3-4 ore sub agitare lentă. Excesul de colorant se poate îndepărta prin spălare de 3-4 ore cu apă distilată.

Decolorarea gelului

Se înlocuiește soluția de decolorare cu soluție proaspătă la 30 de minute.

Vizualizarea gelului

Gelul cu fracțiunile proteice separate poate fi vizualizat direct sau imagistic. Vizualizarea directă implică o serie de erori mari la cuantificarea benzilor, aprecierea maselor moleculare relative. Utilizarea unor metode standardizate elimină aceste erori. Pentru aceasta, este necesară fotografierea gelurilor și analiza cu programe specializate (ex. Image J).

Determinarea maselor moleculare relative a proteinelor

Dacă în gel se încarcă o soluție marker de proteine standard (cu mase moleculare cunoscute), prin reprezentarea grafică a greutății moleculare a proteinelor din marker în funcție de distanța lor relativă de migrare, se poate evalua greutatea moleculară a proteinelor din proba de analizat.

Cuantificarea conținutului proteic în probă

Pentru determinarea cantitativă a proteinelor din proba de analizat este necesar ca în gel să se încarce probe standard cu proteină cu concentrații cunoscute. Recomandate sunt standardele pe baza de proteina de interes. În absența standardelor, se pot folosi proteine comune purificate (albumina serică bovină BSA). Pentru cuantificarea foarte precisă a conținutului proteic (mg proteină) se poate folosi Metoda Bradford, caracterizată de rapiditate, sensibilitate ridicată și simplitate (Mihășan și colab., 2012).

Interpretarea rezultatelor

În funcție de ponderea fracțiilor proteinelor serice se pot identifica diferite afecțiuni (Figura 12.4).

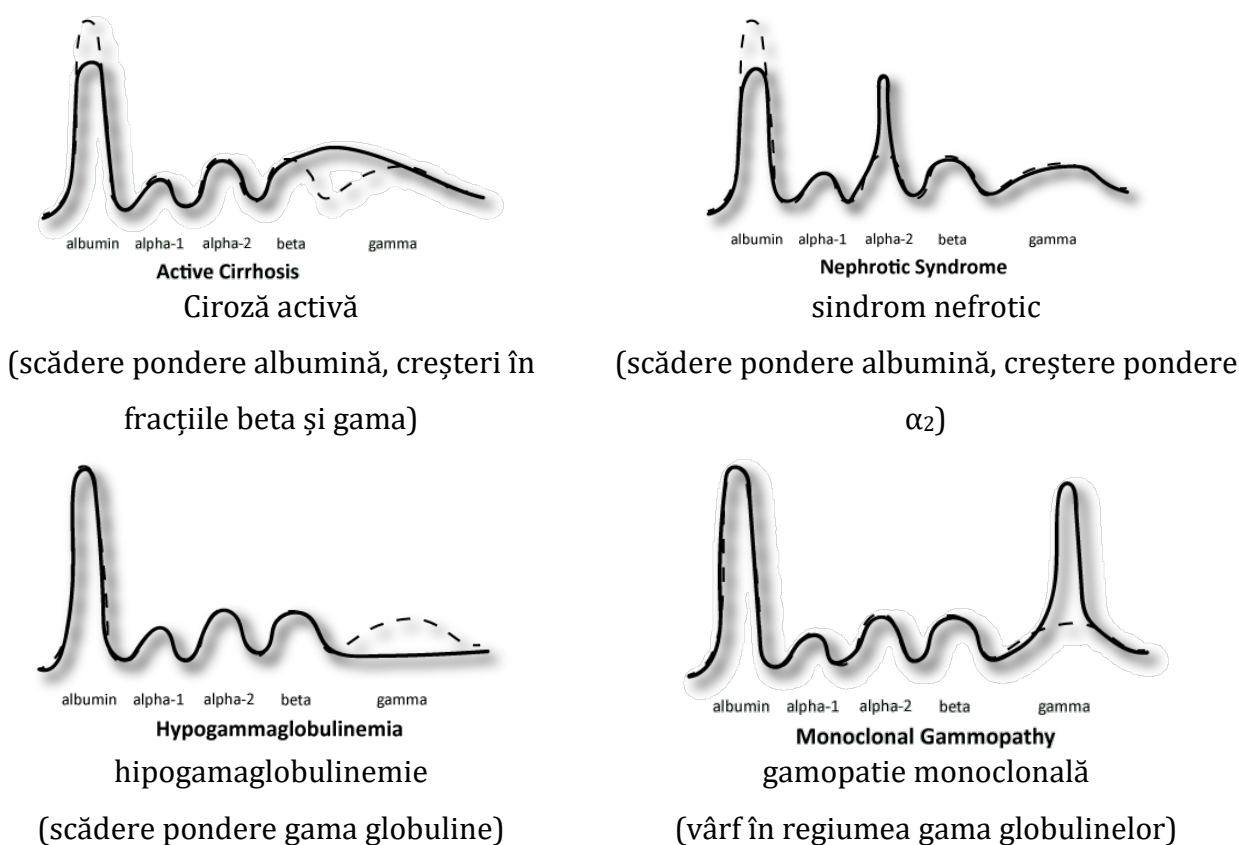


Figura 12.4. Anomalii ale ponderii proteinelor serice
(<https://clsresource.com/index.php/serum-proteins/>)

Electroforeza ADN pe gel de agaroză

Principiul metodei

Metoda de analiză verifică integritatea ADN-ului genomic și evaluează gradul de

contaminare cu ARN. În acest scop, extractul de ADN este supus electroforezei pe gel de agaroză. În mediu bazic sau neutru, acizii nucleici au sarcină electrică generală negativă iar sub acțiunea câmpului electric din cuva de electroforeză migrează către anod. Bromura de etidiu, agent fluorocrom care se intercalează între planurile formate de bazele azotate ale macromoleculei de ADN, se folosește pentru vizualizarea moleculelor de ADN. Excitând bromura de etidiu în lumină UV (250 nm - 310 nm) se produce o emisie în domeniul vizibil, la 520 nm (culoare roz-portocalie).

Izolarea ADN genomic din sânge (Georgescu și Costache, 2009)

Principiul metodei

Pentru izolarea ADN genomic din sânge se parcurg două etape. În prima etapă sunt izolate limfocitele din probele de sânge proaspete, iar în etapa a doua se izolează ADN-ul din limfocite. Deproteinizarea probelor se face cu soluție salină saturată, iar ADN se precipită cu etanol.

Materiale și echipamente

Probe de sânge proaspete recoltate prin proceduri standard (anticoagulant EDTA, heparină sau citrat de sodiu)

Tris solid (trisaminometan, trometamină, trometamol sau THAM) solid

SDS (dodecil sulfat de sodiu) solid

Tris-HCl (pH 8): se omogenizează 121,1 g Tris și 800 mL apă distilată, se ajustează pH-ul la aproximativ 8 cu HCl (aprox. 42 mL) și se aduce la volum de 1L cu apă distilată

TRIS 17 mM (pH 7,5): 2,0594 g TRIS se dizolvă în 800 mL apă distilată, se adaugă pelete de NaOH pentru ajustarea pH-ului la 7.5 și se aduce la volum de 1 L cu apă distilată

Soluția EDTA 0,5 M (pH 8.0): 186,1 g EDTA•2H₂O se dizolvă în 800 mL apă distilată prin agitare puternică, se adaugă NaOH solid (aprox. 20 g) până la pH 8 și se aduce la semn dacă este cazul. După filtrare, soluția se autoclavează; se poate păstra în frigider

Soluția EDTA 1 mM: se omogenizează 0,2922 g EDTA cu 800 mL apă distilată prin agitare puternică și se aduce la volum de 1 L cu apă distilată

SDS 0,5%: 5 g SDS se dizolvă în apă distilată în balon de 1 L; pentru solubilizare completă se poate încălzi pe baie de apă la 65°C

Etanol: 100% și 70%

Soluție NaCl 1,37 M: 180,45 g NaCl se omogenizează în apă distilată și se aduce la 1 L cu apă distilată

Soluție KCl 27 mM: 2,0115 g KCl se omogenizează în apă distilată, se aduce la volum de 1 L

Soluție Na₂HPO₄ x 7 H₂O 43 mM: 11,524 g Na₂HPO₄ x 7 H₂O se dizolvă în apă distilată și se aduce la volum de 1 L

Soluție KH₂PO₄ 14 mM: 1,904 g KH₂PO₄ se dizolvă în apă distilată, se aduce la volum de 1 L

Clorură de amoniu 140 mM: 7,49 g NH₄Cl se dizolvă în apă distilată, se aduce la 1 L

Tampon clorură de amoniu: clorură de amoniu 140 mM, TRIS 17 mM (pH 7,5)

Tampon fosfat salin (PBS) 10X: 1,37 M NaCl, 27 mM KCl, 43 mM Na₂HPO₄ x 7 H₂O, 14 mM KH₂PO₄. Se prepară sub forma unei soluții concentrate 10X și se diluează înainte de folosire. Soluția diluată are un pH de aproximativ 7,3 și se stochează la temperatura camerei pe termen nelimitat

Tampon de liză: 10 mM TRIS-HCl (pH 8), 10 mM EDTA (pH 8), 0,5% SDS. Reactivul se poate stoca la temperatura camerei preparare soluție finală

Soluție salină saturată NaCl 18%: 180 g NaCl se dizolvă în apă distilată și se aduce la volum de 1 L

Proteinază K: 10 mg/ml

Tampon de resuspendare TRIS-EDTA (pH 8): 10 mM TRIS-HCl, 1 mM EDTA

Ribonuclează: 2 mg/ml

Apă ultrapură

Microcentrifugă

Agitator

Sticlărie de laborator: pipete, vârfuri, eprubete Ependorf

Echipament individual de protecție

Mod de lucru

Etape I: Izolarea limfocitelor

1. Se amestecă 10 ml sânge cu 40 ml tampon NH₄Cl într-un tub de centrifugă de 50 ml.
2. Se plasează eprubeta în gheață 30 de minute – 1 oră, până la închiderea culorii soluției și se centrifughează la 800 rpm timp de 10 minute la temperatura camerei.
3. Se elimină supernatantul iar sedimentul se usucă pe hârtie de filtru și se spală cu 20 ml PBS prin agitare.
4. Centrifugare la 700 rpm, 10 minute la temperatura camerei. Se îndepărtează supernatantul ,

se usucă pe hârtie de filtru sedimentul și se spală cu 5 ml PBS prin agitare.

5. Centrifugare la 700 rpm, 10 minute la temperatura camerei.

6. Se îndepărtează supernatantul, iar sedimentul de limfocite se folosește imediat pentru extracția ADN.

7. *OPȚIONAL: Dacă extracția se efectuează în altă zi, sedimentul de limfocite se păstrează -20°C. Înainte de folosire, sedimentul se resuspendă în 1 ml PBS iar limfocitele se transferă într-o eprubetă de centrifugare nouă. După a adoua spălare cu 1 mL PBS a tubului în care s-a realizat izolarea conținutul se transferă în același tub.*

8. Centrifugare la 700 rpm timp de 10 minute. Supernatantul se îndepărtează iar sedimentul se stochează la -20°C.

Etapa II: Extracția ADN

1. Se adaugă 1 ml PBS peste sedimentul de limfocite proaspăt sau înghețat și se vortexează până la aducerea în suspensie a tuturor celulelor.

2. Se adaugă 100 μl proteinază K și 10 ml tampon de liză și se amestecă ușor.

3. Amestecul se incubează 65°C timp de 1 h sau 37°C peste noapte. Pentru o extracție mai eficientă, și o calitate mai bună a ADN-ului extras se preferă incubarea peste noapte.

4. Se adaugă 10 μl soluție ribonuclează, se omogenizează prin inversarea tubului și se incubează 1 h la 37°C.

5. Se adaugă 4,3 ml soluție salină saturată și se amestecă puternic 30 de secunde.

6. Centrifugare la 5000 rpm, 10 minute și 4°C. Supernatantul se transferă într-un tub de 50 ml.

7. Peste supernatant se adaugă încet, pe pereți și prin rotirea constantă a tubului, 30 ml de etanol absolut. Se amestecă ușor, prin inversia tubului până când ADN precipită.

8. Se centrifughează 3 minute la 10000 rpm. Supernatantul se înlătură prin înclinarea tubului, iar sedimentul este spălat cu etanol 70%, 30-40 minute, cu agitare ușoară.

9. Centrifugare 3 minute la 10000 rpm. Supernatantul este înlăturat prin înclinarea tubului. Sedimentul este uscat la 37°C timp de 15-20 de minute.

10. ADN-ul se resuspendă în 2 ml tampon TE. Se lasă cel puțin 24 de ore pentru dizolvare completă la 4°C. Se stochează la 4°C pe termen scurt și la -20°C pe termen lung.

Izolarea ADN din plasmă sau ser (Georgescu și Costache, 2009)

Principiul metodei

Cantitățile de ADN probe normale sunt scăzute dar suficiente pentru a servi drept matrice la o reacție de amplificare în lanț (PCR – Polimerase Chain Reaction). Cantități sporite de ADN în ser/plasmă apar în patologii precum cancerul, bolile infecțioase sau autoimune.

Materiale și echipamente

Plasmă sau ser recoltate prin proceduri standard

Tampon de liză 10X: SDS 10%, proteinază K 0,5%, preparat sub formă concentrată și diluat înainte de folosire

Tris-HCl 10 mM: 60,57 g Tris bază se omogenizează în 350 mL apă distilată, se adaugă HCl până la pH 7.4 și se aduce la 500 mL cu apă distilată

EDTA 1 mM (pH 8): 0,2922 g EDTA se dizolvă în 800 mL apă distilată, se adaugă NaOH solid până la pH 8 și se aduce la 1000 mL cu apă distilată

Tampon Tris-EDTA (TE): 10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA (pH 8)

Amestec fenol/cloroform 1:1

Glicogen 10 mg/L

Acetat de amoniu 7,5 M: 288,75 g acetat de amoniu se aduc la volum de 500 mL cu apă distilată

Etanol absolut și etanol 70%

Agitator

Microcentrifugă

Termobloc

Echipament individual de protecție

Mod de lucru

1. Se amestecă 1,5 mL ser/plasmă, cu 1,5 mL tampon de liză 1X, se omogenizează energic și se lasă la incubat peste noapte la 55°C.

2. Se adaugă 3 mL de amestec fenol/cloroform peste amestecul incubat, se omogenizează intens 30 s și se centrifughează 1000 x g timp de 10 minute

3. Supernatantul apos se transferă într-un tub centrifugă și se repetă etapa 2.

4. Supernatantul rezultat în etapa 3 se transferă într-un tub nou și se adaugă 5 μl

glicogen, 1 ml soluție acetat de amoniu și 8 ml de etanol absolut. Se amestecă prin inversia tubului de mai multe ori și se centrifughează 2500 x g timp de 40 de minute.

5. Supernatantul separat se îndepărtează prin înclinarea tubului iar sedimentul se spală în 10 ml de etanol 70% prin agitare ușoară.

6. Se centrifughează la 2500 x g timp de 10 minute. Etanolul se îndepărtează iar sedimentul se usucă în curent de aer sau prin incubare la 37°C timp de 15 minute.

7. Sedimentul uscat este resuspendat într-un volum adecvat de tampon TE sau apă ultrapură.

Electroforeza ADN genomic

Reactivi și echipamente

Extract ADN

Agaroză – puritate electroforetică

Albastru de bromfenol – pulbere

Glicerol

Soluția EDTA 0,5 M (pH 8.0): 186,1 g EDTA•2H₂O se dizolvă în 800 mL apă distilată, se adaugă NaOH solid (aproximativ 20 g) până la pH 8 și se aduce la volum de 1 L. După filtrare, soluția se filtrează și se autoclavează; se păstrează la frigider

Soluția stoc tampon Tris-acetat TAE 10X: se amestecă 48,5 g Tris, 11,4 mL acid acetic glacial și 20 mL EDTA 0,5M (pH 8) (sau 3,7 g EDTA•2H₂O) și apă distilată la volum de 1 L

Soluția tampon Tris-acetat TAE 1X: se diluează 1:10 soluție de TAE 10X (100 mL TAE 10X adus la semn în balon cotat de 1 L). Soluția rezultată va conține 0,4 M tris-acetat (pH aprox. 8.6) și 0,01 M EDTA

Soluție tampon probă: albastru de bromfenol 0,3%, glicerol 30% în soluție TAE 1X

Soluție de bromură de etidiu: 10 mg/mL

Marker proteine standard

Instalația de electroforeză

Cuptor cu microunde

Transiluminator UV

Sticlărie de laborator: pahare, pipete, vârfuri, tuburi Ependorf

Bandă adezivă: sigilarea marginilor matriței înainte de turnarea soluției de agaroză

Balanță analitică

Echipament individual de protecție

Mod de lucru:**Obținerea gelului de agaroză**

Într-un pahar Erlenmayer se adaugă 1 g agaroză în 100 mL tampon de electroforeză TAE 1x și se solubilizează în cuptorul cu microunde în 2-3 etape de câte 1 minut (cu agitare intermediară) până la obținerea unei soluții clare, transparente. Vasul în care se face dizolvarea agarozei trebuie să aibă un volum liber de cel puțin două ori mai mare comparativ cu volumul ocupat de lichid pentru a evita suprapresiunea indusă de acumularea vaporilor de apă rezultați la fierbere. Soluția se răcește la 55°C-60°C, se adaugă 2 μL soluție bromură de etidiu, se omogenizează și se toarnă în matrița amplasată pe o suprafață plană în care a fost fixat piaptănul pentru formarea godeurilor la aproximativ 2 cm de marginea dinspre catod a gelului. Cu ajutorul unui vârf de pipetă se îndepărtează eventualele bule de aer formate la suprafața soluției turnate. După răcirea și întărirea gelului (aprox. 30 - 40 minute la temperatura camerei) se scoate cu grijă piaptănul pentru a nu rupe godeurile și se așează matrița cu gel în cuva de electroforeză orizontală. În cuvă se toarnă soluție tampon de electroforeză TAE 1X, având grijă ca soluția să intre în godeuri și să acopere gelul cu un strat de lichid de aprox. 0,5 - 0,8 cm.

Pregătirea probei în vederea migrării în gel de agaroză

10 μL tampon pentru probe se amestecă cu 15 μL probă de analizat și se încarcă în godeurile din gel, începând cu godeul nr. 2. În primul godeu se încarcă 4 μL de marker proteine standard (cu masă moleculară cunoscută) cu 2 μL de colorant. Godeurile se încarcă ținând pipeta paralelă cu șirul de godeuri, evitând inserarea vârfului pipetei până la baza godeurilor sau introducerea bulelor de aer. Pentru a evita încurcarea probelor, se poate marca pe matriță locul din care începe încărcarea.

Electroforeza

După încărcarea godeurilor cu marker și probă de analizat, se acoperă cuva de electroforeză și se conectează la o sursă de curent la o tensiune în intervalul de 80 - 150 V (tensiuni mai ridicate pot intensifica migrarea dar, în același timp cresc efectul Joule care va avea ca rezultat topirea gelului de agaroză), 150 mA și se lasă să opereze timp de 30 minute - 1 oră. Odată finalizată electroforeza, se oprește sursa de curent, se îndepărtează gelul.

Vizualizarea gelului

Gelul cu fracțiunile proteice separate se poate analiza prin vizualizare directă sau imagistică. Vizualizarea directă implică o serie de erori mari la cuantificarea benzilor, aprecierea maselor moleculare relative. Utilizarea unor metode standardizate elimină aceste erori. Pentru aceasta, este necesară fotografierea gelurilor și analiza cu programe specializate.

Interpretarea rezultatelor

Fiind extrem de voluminoase, moleculele de ADN genomic migrează limitat. Migrarea prin gelul de agaroză este încetată din cauza rezistenței opuse de gel și porozității mici a acestuia.

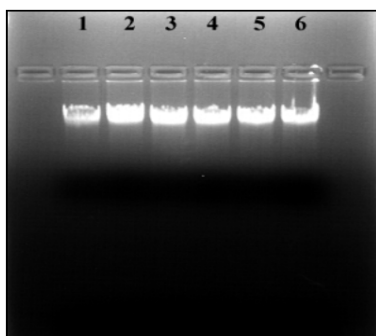


Figura 12.5: Electroforeză de ADN genomic în gel de agaroză în scopul evidențierii integrității acestuia. Liniile 1 – 6: ADN genomic nefragmentat. În cazul unor molecule de ADN integre, nefragmentate, acestea vor putea fi observate sub forma unei benzi compacte, în apropierea godeurilor de start. Cu cât banda este mai groasă și mai intensă, cu atât proba de ADN este mai concentrată și mai nefragmentată. (Georgescu și Costache, 2009)

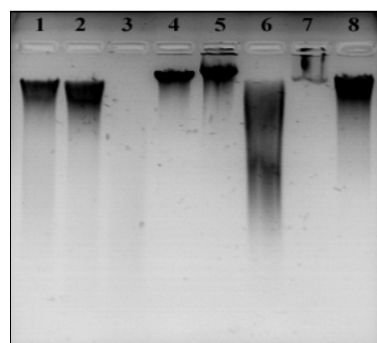


Figura 12.6: Electroforeză de ADN genomic în gel de agaroză în scopul evidențierii integrității acestuia. Liniile 4, 5: ADN genomic nefragmentat; liniile 1, 2, 8: ADN genomic parțial degradat, linia 6: ADN genomic puternic degradat, liniile 3, 7: ADN genomic degradat aproape în totalitate. (Georgescu și Costache, 2009)

În cazul unui ADN genomic deteriorat, fragmentat, benzile apar sub forma unor dâre ("comete"), fără structură compactă (Figura 11). Cu cât ADN este mai degradat, cu atât acestea sunt cu atât mai lungi și mai intense. Acestea rezultă din cauza fragmentelor mici de ADN formate prin scindarea macromoleculelor inițiale ca urmare a păstrării în condiții neadecvate.

Electroforeza lipoproteinelor serice pe gel de agaroză

Principiul metodei

Metoda se bazează pe electroforeza plasmei (recoltată în vacutainer cu anticoagulant EDTA) sau serului cu separarea celor patru fracțiuni (chilocromii, fracțiunea beta, fracțiunea pre-bata și fracțiunea alfa) care vor fi colorate cu Fat Red 7B.

Semnificația testului

Fracțiunilor lipoproteinelor separare prin electroforeză permit tipizarea hiperlipemiilor. În funcție de mobilitatea electroforetică, se pot separa următoarele clase (Figura 12.7):

Chilocromii – conțin trigliceride de origine exogenă (alimentară) și asigură transportul lipidelor de la intestinul subțire la ficat.

Fracțiunea beta (corespunde cu LDL) – provine din catabolizarea VLDL

Fracțiunea pre-beta (corespunde cu VLDL) – forma de transport a lipidelor de la ficat spre țesuturi

Fracțiunea alfa (corespunde cu HDL) – forma de transport a lipidelor de la țesuturi la ficat

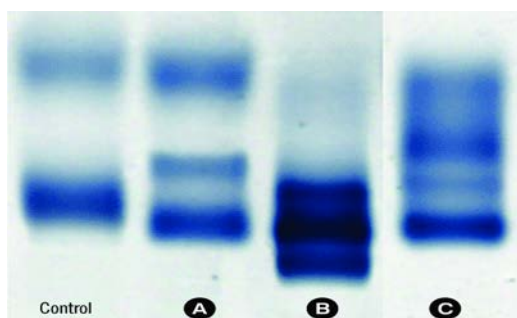
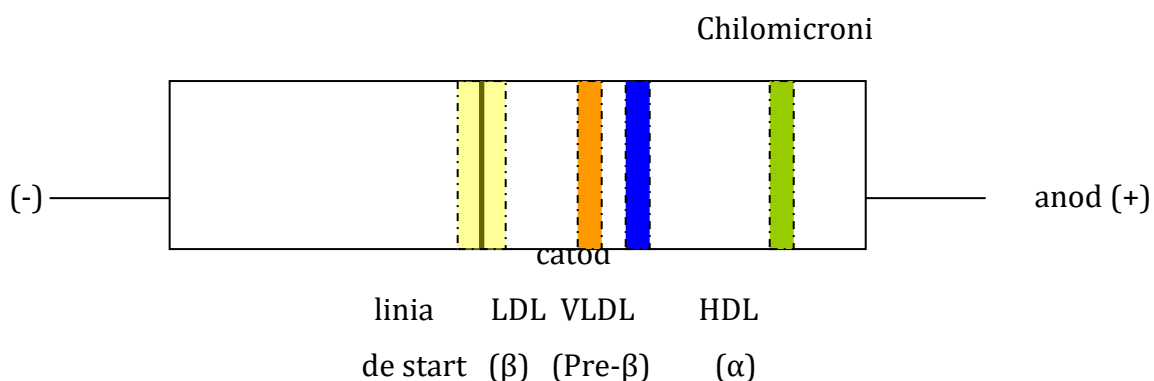


Figura 12.7. Electroforeza lipoproteinelor serice

Materiale și reactivi

Soluția EDTA 0,5 M (pH 8.0): 186,1 g EDTA•2H₂O se dizolvă în 800 mL apă distilată, se adaugă pelete de NaOH (aprox. 20 g) până la pH 8, se filtrează soluția și se autoclavează; se păstrează la frigider

Soluția stoc tampon TAE 10X (Tris-acetat EDTA 10X): 48,5 g Tris, 11,4 mL acid acetic glacial și 20 mL EDTA 0,5M (pH 8) (sau 3,7 g EDTA•2H₂O) și se aduce la volum de 1 L cu apă distilată

Soluția tampon TAE 1X (Tris-acetat EDTA 1X): se obține soluție 1:10 TAE 10X (100 mL

TAE 10X adus la volum de 1 L). Soluția rezultată va conține 0,4 M tris-acetat (pH aprox. 8.6) și 0,01 M EDTA.

Soluție metanol 70%

Agaroză

Colorant Fat Red 7B (=Sudan Red 7B): 0,28% în metanol 60% (w/v)

Tăvi de colorare

Cameră de electroforeză

Etuvă

Cuptor cu microunde

Sticlărie de laborator: pipete, vârfuri, eprubete Ependorf,

Echipament individual de protecție

Mod de lucru

Obținerea gelului de agaroză

Obținerea gelului de agaroză 10 cm x 10 cm, într-un pahar Erlenmayer se adaugă 1,4 g agaroză în 100 mL tampon de electroforeză TAE 1X (pentru gel 10 cm x 15 cm se folosesc 2,1 g agaroză în 150 mL soluție tampon) și se și se solubilizează în cuptorul cu microunde în 2 etape de câte 1 minut (cu agitare intermediară) până la obținerea unei soluții clare, transparente. Vasul în care se face dizolvarea agarozei trebuie să aibă un volum liber de cel puțin două ori mai mare comparativ cu volumul ocupat de lichid pentru a evita suprapresiunea indusă de acumularea vaporilor de apă rezultați la fierbere. Soluția se lasă să se răcească până la 55°C-60°C, se omogenizează și se toarnă în matrița amplasată pe o suprafață plană în care a fost fixat piaptănul pentru formarea godeurilor la jumătatea matriței. Cu ajutorul unui vârf de pipetă se îndepărtează eventualele bule de aer formate la suprafața soluției turnate. După răcirea și întărirea gelului (aprox. 30 minute-1 oră la temperatura camerei) se scoate cu grijă piaptănul pentru a nu rupe godeurile și se așează matrița cu gel în cuva de electroforeză orizontală. În cuvă se toarnă soluție tampon de electroforeză TAE 1x (aceeași cu cea folosită la prepararea gelului), având grijă ca soluția să intre în godeuri și să acopere gelul cu un strat de lichid de aprox. 0,5 – 0,8 cm.

Pregătirea serului în vederea migrării în gel de agaroză

Godeurile se încarcă cu 1 μ L plasmă sau ser ținând pipeta paralelă cu șirul de godeuri, evitând inserarea vârfului pipetei până la baza godeurilor sau introducerea bulelor de aer. Pentru a evita încurcarea probelor, se poate marca pe matriță locul din care începe încărcarea.

Electroforeza

După încărcarea godeurilor se acoperă cuva de electroforeză și se conectează la o sursă de curent la 90 V, 150 mA și se lasă să opereze timp de 35 minute. Odată finalizată electroforeza, se oprește curentul și se îndepărtează gelul.

Colorarea și decolorarea gelului de agaroză

Se șterge umezeala de pe spatele gelului de agaroză, apoi se pune gelul în etuvă și se usucă la $55^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}$ timp de 15-20 minute (sau până la uscare completă). Se scoate gelul de agaroză din cuptor, se lasă la răcit la temperatura camerei și se așează filmul de agaroză uscat cu partea de agaroză în sus pe hârtie de filtru umezită, plasată pe fundul unui vas de colorare. Folosind o pipetă de sticlă curată de 10 ml, se distribuie 10 ml de soluție de lucru Fat Red 7B uniform pe suprafața gelului fără a atinge cu pipeta suprafața acestuia; Fat Red 7 colorează acizii grași din structura lipoproteinelor. Se lasă la colorat timp de patru minute, iar când pata devine albastru închis și începe să precipite, colorarea este completă. Se transferă filmul de agaroză în soluția de limpezire metanol-apă, se agită ușor timp de aproximativ 60 de secunde sau până când fundalul este clar, se șterge umezeala de pe spatele gelului de agaroză și se usucă la $55^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}$ timp de 15—20 de minute sau până la uscare completă

Vizualizarea gelului

Se interpretează vizual sau se cuantifică folosind echipamentul densitometric corespunzător la 520 nm.

Interpretarea rezultatelor

Valori normale

Chilocromi	0 %
Beta	45 – 55%
Prebeta	15 – 25%
Alfa	25 – 25%

Valori ridicate (hiperlipidemii)

Tipul I - valori crescute ale chilocromilor

Tipul IIa - creșterea fracțiunii beta

Tipul III - apariția unei fracțiuni beta (formată din resturi de chilomicroni și resturi de VLDL denumite și IDL - intermediar)

Tipul IIb - creșterea fracțiunilor beta și prebeta

Tipul IV - creșterea fracțiunii prebeta

Tipul V - creșterea chilocromilor și a fracțiunii prebeta

Electroforeza hemoglobinei pe gel de agaroză

Principiul metodei

Metoda se bazează pe electroforeza unui hemolizat preparat din sânge în mediu acid sau bazic, proces pe durata căruia diferite fracțiuni ale hemoglobinei se mișcă cu viteze diferite spre catod. HbA are sarcina electrică pozitivă cea mai mare și se va deplasa cu viteza cea mai ridicată spre catod. Încărcătura electrică pozitivă a HbF este mai redusă comparativ cu a HbA și acesta se va mișca mai lent, iar HbA₂ are mobilitatea cea mai redusă (Figura 12.8). Metoda permite identificarea fracțiunilor specifice ale hemoglobinei circulante pentru a evidenția hemoglobinopatiilor și sindroamelor talasemice.

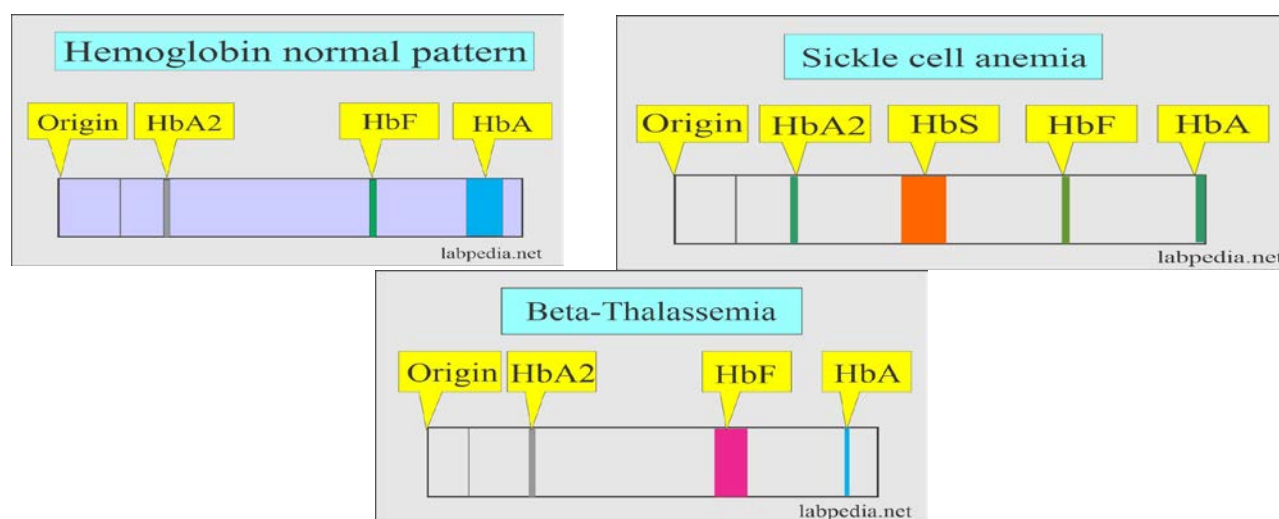


Figura 12.8. Structura fracțiilor specifice hemoglobinei circulante în diferite patologii (<https://labpedia.net/haemoglobin-electrophoresis-hb-electrophoresis/>)

Reactivi și echipamente

Sânge recoltat conform procedurilor standard pe EDTA, citrat sau heparină

EDTA

Saponină

Acetat de sodiu – solid

Acid acetic glacial

HCl concentrat

Tris baza - solid

CCl₄

Apă distilată

Agaroză sau agar

Soluție tampon acid acetic: în 800 mL apă distilată se dizolvă 5,772 g of acetat de sodiu și 1, 778 g acid acetic. Se acidifiază soluția la pH-ul aprox. 5 (adăugare de HCl) și se aduce la 1 L cu apă distilată

Tris-glicină pH 9.2 (20X): în 800 mL apă distilată se adaugă 24,2 g Tris și 150.1 g glicină, se omogenizează și se aduce la 1 L cu apă distilată

Soluție tampon pentru probe: se dizolvă 0,042 g albastru de bromfenol în 4 mL apă distilată, se adaugă 2 mL tampon TRIS-glicină pH 9.2 și 4 ml glicerol; soluția se păstrează în frigider

Soluție de colorare albastru de bromfenol: 20 mg bromophenol blue se omogenizează în 200 ml apă distilată care conține 2 mL soluție tampon acid acetic

Centrifugă

Cuptor cu microunde

Instalație de electroforeză

Sticlărie de laborator: pipete, vârfuri, eprubete Ependorf,

Echipament individual de protecție

Mod de lucru

Obținerea hemolizatului sanguin

Metoda 1:

1. Sânge coagulat sau celule roșii se amestecă cu același volum de apă distilată.
2. Se păstrează peste noapte în congelator și se folosește supernatantul.

Metoda 2:

1. 1 gram acid etilendiaminotetracetic (EDTA) și 0,1 grame de saponină se omogenizează în 500 ml apă distilată.
2. Se spală 5 minute celulele roșii din sânge cu soluție salină și se amestecă cu un volum egal din amestecul EDTA-saponină. Soluția poate fi utilizată la electroforeză.

Metoda 3:

1. Se centrifughează proba se sânge și se îndepărtează zona lichidă superioară (plasma și buffy coat)
2. Se spală prin centrifugare celulele roșii de trei ori cu soluție salină, aruncând de fiecare dată supernatantul
3. Se adaugă peste celulele spălate un volum egal de apă distilată și ½ volum de CCl₄

4. Amestecul se centrifughează 5 minute la 1500 x g, cu formarea a trei straturi: stratul superior este hemolizatul, stratul intermediar este stroma și stratul inferior CCl_4

5. Se extrage cu o pipetă supernatantul (culoare roșietică, clar), se ajustează concentrația hemoglobinei cu apă distilată

6. Se execută imediat electroforeza

Electroforeza hemolizatului sanguin(<https://www.youtube.com/watch?v=bj70asFPWfE>)

Obținerea gelului de agaroză

Pentru un gel 10 cm x 10 cm, într-un pahar Erlenmayer se adaugă 1,4 g agaroză în 100 mL tampon de electroforeză TRIS-glicină pH 9.2 (pentru gel 10 cm x 15 cm se folosesc 2,1 g agaroză în 150 mL soluție tampon) și se solubilizează în cuptorul cu microunde în 2 etape de câte 1 minut (cu agitare intermediară) până la obținerea unei soluții clare, transparente. Vasul în care se face dizolvarea agarozei trebuie să aibă un volum liber de cel puțin două ori mai mare comparativ cu volumul ocupat de lichid pentru a evita suprapresiunea indusă de acumularea vaporilor de apă rezultați la fierbere. Soluția se lasă să se răcească până la 55°C-60°C și se toarnă în matrița amplasată pe o suprafață plană în care a fost fixat piaptănul pentru formarea godeurilor la aproximativ 2 cm de anod (polul marcat cu negru??? așa apare în filmulet). Cu ajutorul unui vârf de pipetă se îndepărtează eventualele bule de aer formate la suprafața soluției turnate. După răcirea și întărirea gelului (aprox. 30 minute-1 oră la temperatura camerei) se scoate cu grijă piaptănul pentru a nu rupe godeurile și se așează matrița cu gel în cuva de electroforeză orizontală. În cuvă se toarnă soluție tampon de electroforeză Tris-glicină (aceeași cu cea folosită la prepararea gelului), având grijă ca soluția să intre în godeuri și să acopere gelul cu un strat de lichid de aprox. 0,5 – 0,8 cm. Pentru o vizualizare mai ușoară, se poate amplasa sub cuva de electroforeză o coală de hârtie colorată (albastru deschis).

Pregătirea serului în vederea migrării în gel de agaroză

Pe o lamă se amplasează un volum de 5 μL tampon pentru probe peste care se introduc 15 μL hemolizat. Se omogenizează prin aspirare și refulare și se încarcă amestecul în godeurile din gel. Godeurile se încarcă ținând eprubeta paralel cu șirul de godeuri, evitând inserarea vârfului pipetei până la baza godeurilor sau introducerea bulelor de aer. Pentru a evita încurcarea probelor, se poate marca pe matriță locul din care începe încărcarea.

Electroforeza

După încărcarea godeurilor cu probă se acoperă cuva de electroforeză și se conectează la o sursă de curent la 30 mA (40 V) și se lasă să opereze timp de 3 ore la temperatură -4°C. Odată finalizată electroforeza se oprește sursa de curent.

Colorarea gelului

Gelul este lăsat să alunece din matriță în baia de colorare și menținut timp de 20 de minute. După colorare, gelul este preluat din baia de colorare și introdus în baia cu apă distilată pentru spălare.

Vizualizarea gelului

Gelul conținând fracțiunile hemoglobinei poate fi vizualizat în lumină UV.

Interpretarea rezultatelor

Tabelul 12.2. Intervale biologice de referință pentru fracțiunile specifice hemoglobinei circulante (<https://www.medicover.ro/analize/electroforeza-hemoglobinei/>)

Vârsta	HbA%	HbF%	HbA2%
< lună	8,1 – 62,7	49,9 – 98,4	0 – 1,8
1 – 3 luni	37,3-88,8	10,3-64,6	0,3-2,4
3-6 luni	67-96,7	5,2-34,5	1,7-2,7
6-9 luni	82,4-98,8	1,1-28,5	2,0-3,0
9-15 luni	91,9-98,7	0,2-9,9	2,2-3,2
15 luni-2 ani	94,9-97,8	0-5,5	2,4-3,1
2-6 ani	95,9-97,9	0-1,6	2,2-3,2
6-17 ani	96,4-98,2	0-0	1,9-3,3
≥18 ani	96,7-97,8	≤0,5	2,2-3,2

Beta talasemiile minore: asociază valori crescute ale HbA2 (3.2-7%), hemoglobina fetală ușor ridicată (0.5-6%), iar restul este reprezentat de HbA.

Beta talasemia: prezintă valori variabile ale HbA2, cu valori ale HbF cuprinse în intervalul 20-80%.

Beta talasemia majoră: există majoritar hemoglobina F (aproximativ 90% din totalul hemoglobinei circulante).

Electroforeza pe gel de poliacrilamidă SDS-PAGE

Principiul metodei

Electroforeza se desfășoară în sistem vertical, având ca suport the migrare gel de poliacrilamidă a cărei porozitate poate fi reglată. Mediul se toarnă între două plăci din sticlă etanșezate lateral pentru a evita contactul cu oxigenul, contactul cu electrozii realizându-se prin părțile inferioară și superioară. În general, metoda se aplică pentru separarea proteinelor. Moleculele proteice pot fi separate fie în stare nativă (electroforeză nativă (*engl.* Native-PAGE), fie în stare denaturată (SDS-PAGE).

1. În cazul SDS-PAGE, **denaturarea proteinelor** în catenele polipeptidice componente se realizează la temperatură ridicată folosind cel mai frecvent un detergent anionic denumit dodecilsulfat de sodiu (SDS). SDS are o coadă hidrofobă formată din 12 atomi de carbon și un cap sulfonacid hidrofil. Dodecilsulfatul de sodiu (SDS) este un surfactant anionic (detergent anionic) încărcat cu sarcină electrică negativă datorată grupărilor sulfat din structură. Acesta care se leagă prin legături non-covalente de regiunile hidrofobe ale proteinelor cu sarcină electrică pozitivă determinând despachetarea și eliberarea lanțurile polipeptidice din agregatele moleculare, iar pe măsură ce are loc desfacerea structurii terțiare a proteinelor SDS va distruge și celelalte forțe care susțin structura proteinei (legături van der Waals, legături de hidrogen). Prin atașarea la molecula proteinelor, SDS maschează sarcina lor electrică și le conferă sarcină electrică negativă, ceea ce face ca toate proteinele să migreze în aceeași direcție spre anod și să se separe în funcție de masa lor moleculară (nu în funcție de sarcina electrică). Electroforeza decurge la pH = 8.3 când toate grupările sulfat din structura SDS sunt deprotonate și sunt încărcate cu sarcină electrică negativă.

2. La soluția proteică se adaugă un **agent reducător** (β -mercaptoetanol sau ditiotreitol) care reduce punțile disulfidice (-S-S-) dintre lanțurile polipeptidice. Agentul reducător se atașează de catenele polipeptidice proporțional cu lungimea lor și exercită un efect de ecranare a sarcinilor electrice datorate încărcării aminoacizilor. Structura cuaternară a proteinelor nu este destabilizată complet sub acțiunea SDS datorită faptului că este menținută prin legături -S-S-. Folosirea unui agent reducător distruge legăturile sulfidice și permite obținerea structurii liniare a proteinelor. Cei mai frecvenți agenți reducători sunt β -mercaptoetanol (BME) și dithiothreitol (DTT). Mecanismul de acțiune al lor este indicat în Figura 12.9.

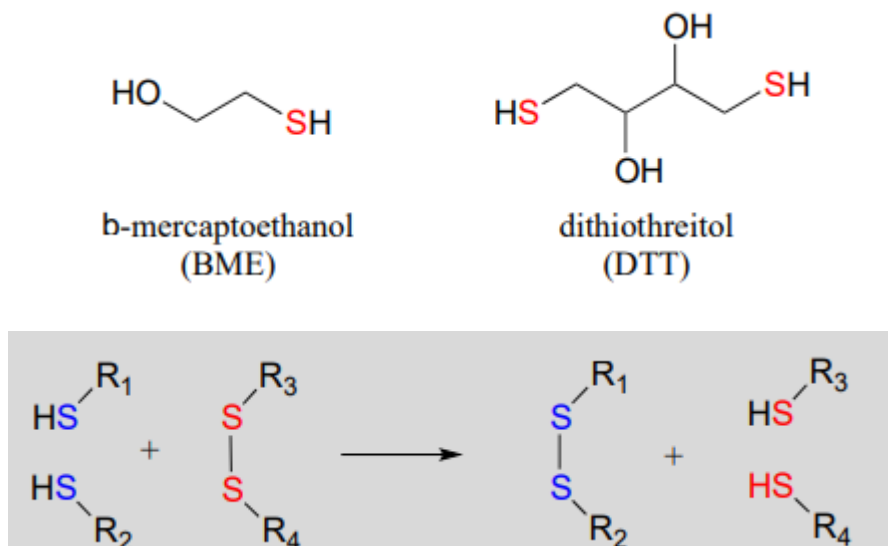


Figura 12.9. Mecanismul de acțiune al agenților reducători

(https://chem.libretexts.org/Bookshelves/Organic_Chemistry/Book%3A_Organic_Chemistry_with_a_Biological_Emphasis_v2.0_%28Soderberg%29/15%3A_Oxidation_and_Reduction_Reactions/15.07%3A_Redox_Reactions_of_Thiols_and_Disulfides)

BME reduce legăturile disulfidice intra și inter-moleculare ale proteinelor și permite o separare după dimensiunea lanțurilor proteice și nu după forma acestora. Ambii agenți reducători conțin în structură o grupă tiol (-SH) al cărui proton este labil și este îndepărtat cu formarea -S⁻ (tiol) încărcat cu sarcină electrică negativă. Gruparea tiol, încărcată cu sarcină electrică negativă, atacă unul dintre atomii de S din legaturile disulfidice -S-S din structura proteinelor (oxidare). Agentul reducător conține acum legătura disulfură (oxidată), iar atomii de sulf de pe analiții proteici care au fost cândva implicați în legătura disulfură sunt acum legați de un proton (au fost reduși la două grupări tiol).

3. Tris-hydroxymethyl-aminomethane (Tris) este baza conjugată a soluției buffer care are rolul de a proteja de degradare lanțurile proteice sub acțiunea H⁺ sau HO⁻ rezultate din degradarea altor componente, sau de acțiunea CO₂ din atmosferă. De asemenea, are rolul de a menține pH-ul constant la 6,8, să inhibe o serie de enzime (proteaze) care ar degrada lanțurile proteice, favorizând o separare maximă în urma electroforezei. Valoarea pH = 6,8 este similară cu cea a gelului de separare și apropiată de punctul izoelectric (pI) al glicinei (6.08), iar tamponul de rulare SDS-PAGE folosește un sistem tampon tris-glicină (nu tris-HCl). În tehnica SDS-PAGE, toate componentele tris (tris-HCl, analiții proteici și glicina (din tamponul de rulare))

intră toate în gelul de stivuire în același timp. Anionii Cl⁻ se mișcă prin gelul de concentrare datorită dimensiunilor lor relativ mici și complet încărcate negativ. Glicina, pe de altă parte, migrează relativ încet prin gelul de stivuire, deoarece este deprotonată doar o fracțiune din timp (pH-ul gelului de stivuire este doar puțin peste pI). Analizii proteici, între timp, migrează cu o viteză care se află între cele două extreme ale Cl⁻ și glicinei. Acest lucru are ca rezultat un efect sandwich și toți analiții sunt stivuiți împreună înainte de a intra în gelul de migrare al glicinei (6,08)

4. Glicerolul din soluția tampon Laemmli are rolul de a crește densitatea proteinelor din proba de analizat astfel încât să favorizeze căderea acestora la baza godeurilor din gel. În acest fel se minimizează pierderea de proteine în soluția tampon sau în godeuri.

5. Colorantul: pentru a indica vizual locația probei în godeurile de gel SDS-PAGE în timpul încărcării, opțional se poate adăuga un colorant la tamponul de probă ca indicator sau colorant de urmărire. Albastrul de bromofenol este cel mai comun, de unde și numele care transformă tamponul Laemmli în albastru. Toate moleculele de colorant migrează împreună prin gelul de rezolvare mult mai repede decât analiții proteici și merg înaintea proteinelor într-o linie numită "front de colorant".

Pregătirea probelor

Într-un tub Eppendorf se introduc soluție tampon pentru probe:soluție probă 1:1 (v:v), se omogenizează amestecul și se încălzește în apă la fierbere pentru 2-5 minute (<https://sepmag.eu/blog/background-of-laemmli-buffer/>). După răcire probele se încarcă în godeurile din gel.

Turnarea gelului de poliacrilamidă

1. Se assemblează plăcile din sticlă pentru turnarea gelului de poliacrilamidă conform indicațiile producătorului echipamentului de electroforeză. Dacă nu se cunoaște volumul de gel necesar (nu este menționat de producător), acesta se obține prin măsurarea volumului de apă care încapă între plăcile din sticlă montate.

2. Prepararea gelului de migrare (separare): se prepară volumul de gel de migrare necesar conform Tabelului 12.3. Concentrația gelului se alege în funcție de proba de analizat. Pentru analiza unei probe necunoscute se poate începe cu o concentrație de 10-12%. Componentele trebuie să se adauge în ordinea menționată în Tabelul 12.3 pentru a evita polimerizarea accidentală a acrilamidei. Se omogenizează conținutul flaconului și se trece la etapa următoare. Concentrația gelului de migrare (separare) depinde de masele proteinelor supuse separării (Tabelul 12.4).

3. Turnarea gelului de migrare: amestecul se toarnă între cele două plăci din sticlă, gradul de umplere stabilindu-se astfel încât să se poată introduce pieptănul, la capătul acestuia lăsându-se un spațiu de 1 cm pentru gelul de concentrare. Se adaugă cu grijă etanol peste soluția de acrilamidă proaspăt turnată, cu rolurile: (i) eliminarea eventualelor bule de aer formate la suprafață, (ii) asigurarea formării unei margini superioare drepte și bloca difuzia oxigenului în soluția de acrilamidă (O_2 inhibă polimerizarea). După aproximativ 30 de minute cât durează polimerizarea se elimină C_2H_5OH de la partea superioară a gelului, se clătește spațiul dintre plăci cu apă distilată și se absorbe excesul de apă cu hârtie de filtru.

4. Prepararea gelului de concentrare: se prepară conform Tabelului 12.4, omogenizând rapid componentele (gelul de concentrare polimerizează mai rapid decât gelul de separare).

5. Turnarea gelului de concentrare: soluția se toarnă atent deasupra gelului de migrare (separare) și se inserează rapid pieptănul (se evită includerea bulelor de aer); polimerizarea este finalizată după aprox. 30 minute. Se scoate pieptănul, se spală godeurile cu apă distilată și se îndepărtează apa în exces.

6. Adăugarea soluției tampon: plăcile din sticlă cu gel se prind în cuva de electroforeză (conform indicațiile producătorului) și se umple cuva cu soluție *Tampon de electroforeză Tris-Glicină-SDS*.

În cazul în care se folosesc kit-uri de turnare a gelurilor, se respectă procedurile de turnare indicate în cartea tehnică.

Tabelul 12.3. Componentele necesare preparării gelului de separare de poli-acrilamidă în SDS-PAGE (Sambrook și colab., 1989, Mihășan și colab., 2012)

Concentrația gelului	Component	Volumul necesar din fiecare component (mL) pentru a obține un volum final de:							
		5 mL	10 mL	15 mL	20 mL	25 mL	30 mL	40 mL	50 mL
6 %	Apă distilată	2,6	5,3	7,9	10,6	13,2	15,9	21,2	26,5
	Acrilamidă 30%	1,0	2,0	3,0	4,0	5,0	6,0	8,0	10,0
	Tris 1,5 M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,004	0,008	0,012	0,016	0,020	0,024	0,032	0,004
8 %	Apă distilată	2,3	4,6	6,9	9,3	11,5	13,9	18,5	23,2
	Acrilamidă 30%	1,3	2,7	4,0	5,3	6,7	8,0	10,7	13,3

	Tris 1,5 M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,003	0,006	0,009	0,012	0,015	0,018	0,024	0,03
10 %	Apă distilată	1,9	4,0	5,9	7,9	9,9	11,9	15,9	19,8
	Acrilamidă 30%	1,7	3,3	5,0	6,7	8,3	10,0	13,3	16,7
	Tris 1,5 M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,01	0,012	0,016	0,02
12 %	Apă distilată	1,6	3,3	4,9	6,6	8,2	9,9	13,2	16,5
	Acrilamidă 30%	2,0	4,0	6,0	8,0	10,0	12,0	16,0	20,0
	Tris 1,5 M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	20,0
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,010	0,012	0,016	0,02
15 %	Apă distilată	1,1	2,3	3,4	4,5	5,7	6,9	9,2	11,5
	Acrilamidă 30%	2,5	5,0	7,5	10,0	12,5	15,0	20,0	25,0
	Tris 1,5 M pH 8,8	1,3	2,5	3,8	5,0	6,3	7,5	10,0	12,5
	SDS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	APS 10%	0,05	0,1	0,15	0,2	0,25	0,3	0,4	0,5
	TEMED	0,002	0,004	0,006	0,008	0,010	0,012	0,016	0,02

Tabelul 12.4. Componentele necesare preparării gelului de concentrare de poli-acrilamidă în SDS-PAGE (Sambrook și colab., 1989, Mihășan și colab., 2012)

Component	Volumul fiecărui component (mL) necesar obținerii volumului final de:							
	1 mL	2 mL	3 mL	4 mL	5 mL	6 mL	8 mL	10 mL
Apă distilată	0,68	1,4	2,1	2,7	3,4	4,1	5,5	6,8
Acrilamidă 30%	0,17	0,33	0,5	0,67	0,83	1,0	1,3	1,7
Tris 1,5 M pH 6,8	0,13	0,25	0,38	0,5	0,63	0,75	1,0	1,25
SDS 10%	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
APS 10%	0,01	0,02	0,03	0,04	0,05	0,06	0,08	0,1
TEMED	0,001	0,002	0,003	0,004	0,005	0,006	0,008	0,01

Tabel 12.5. Corelația dintre concentrația gelului de separare (migrare) și masele proteinelor supuse separării (Ausubel, 2002; Mihășan și colab., 2012)

Concentrația gelului de migrare (separare), %	Limite mase proteine, kDa
6	60 – 200
8	30 – 95
10	16 – 70
12	12 - 60
15	12 - 45

Separarea electroforetică

Se conectează la curent cuva de electroforeză, considerându-se intensitatea curentului ca mărime constantă în funcție de dimensiunile gelului folosit. Pentru gelurilor mini se folosește un curent de 10 mA/gel până când frontul colorantului atinge limita de separare dintre geluri. Se modifică apoi intensitatea curentului la 15 mA/gel până când frontul colorantului atinge limita inferioară a gelului de migrare (sau 100 V în gelul de concentrare timp de aprox. 15 minute și se crește la 200 V în gelul de migrare; un timp total de electroforeză de aprox. 75 minute – din procedură). La finalul migrării, plăcile din sticlă se ridică din cuvă, se așează pe o foaie de hârtie de filtru și se desfac cu mare atenție pentru recuperarea gelului. Se marchează colțul din dreapta jos al acestuia pentru orientarea ulterioară. Se spală gelul cu 200 mL apă distilată pentru a îndepărta SDS (interferă în colorare) și se introduce în vasul pentru colorare. Pentru diminuarea riscului de rupere a gelului la mutarea lui de pe placa de sticlă în vasul de colorare se antrenează gelul cu un jet de apă dintr-o pisetă.

Colorarea și decolorarea gelului de poliacrilamidă

Colorarea gelului se face cu Comassie Brilliant Blue R-250. Colorantul se leagă specific de toate moleculele proteice iar acestea vor apărea colorate uniform în albastru pe un fond transparent. După finalizarea electroforezei, se clătește gelul de poliacrilamidă cu apă distilată pentru spălarea SDS-ului, și se amplasează în vasul pentru colorare (gelul trebuie să fie acoperit cu soluția de colorare). Se omogenizează două ore și apoi se îndepărtează colorantul.

Pentru decolorare se spală gelul cu apă distilată, se imersează gelul în soluția de decolorare și se menține 4-8 ore. Se schimbă periodic soluția de decolorare. Decolorarea se consideră finalizată când fundalul devine transparent. Se întâmplă uneori ca după decolorare benzile să fie ușor difuze iar fundalul ușor colorat. Prin păstrarea gelului în soluția de fixare 10-20 ore rezolvă aceste probleme. Se poate mări viteza de decolorare prin:

- a. folosirea unei soluții de acid acetic 10% și metanol 30%; prin păstrarea îndelungată a

gelului în această soluție scade intensitatea benzilor corespunzătoare fracțiilor proteice;

b. încălzirea soluției de decolorare la temperaturi $> 45^{\circ}\text{C}$;

După finalizarea decolorării, gelul poate fi analizat prin fotografiere, densitometrare, scanare sau poate fi păstrat în soluția de fixare pentru perioade mari de timp.

Determinarea maselor moleculare relative a proteinelor

Dacă în gel se încarcă o soluție marker de proteine standard (cu mase moleculare cunoscute), prin reprezentarea grafică a greutății moleculare a proteinelor din marker în funcție de distanța lor relativă de migrare, se poate evalua greutatea moleculară a proteinelor din proba de analizat.

Cuantificarea conținutului proteic în probă

Pentru determinarea cantitativă a proteinelor din proba de analizat este necesar ca în gel să se încarce o probă standard cu proteine de concentrații cunoscute. Se folosesc standardele care conțin proteina de interes, iar în lipsa lor se pot utiliza proteine comune purificate (albumina serică bovină, BSA). Pentru cuantificarea foarte precisă a conținutului proteic (mg proteină) se poate folosi Metoda Bradford, caracterizată de rapiditate, sensibilitate ridicată și simplitate (Mihășan și colab., 2012).

Electroforeza proteinelor glutenice

Materiale și reactivi

Acrilamidă- puritate pentru electroforeză

N-N'-metilen-bisacrilamidă – puritate pentru electroforeză

Tris bază

HCl

TEMED N,N,N',N'- tetrametiletildiamină

Persulfat de amoniu

Glicină

Albastru de bromfenol

Glicerol

SDS – dodecil sulfat de sodiu

Ditiotreitol sau β -mercaptoetanol

Etanol

Metanol

Acid acetic

Apă distilată

Soluție stoc de acrilamidă 30% – se dizolvă 29 g acrilamidă și 1 g N-N'-metilen-bisacrilamidă în 100 mL apă distilată (pH-ul < 7) și se poate păstra câteva luni în sticle brune, la întuneric, la 4°C; se recomandă ca soluția să fie degazificată sub vid, pentru eliminarea oxigenului dizolvat; soluțiile preparate au timpul de viață limitat, deoarece bisacrilamida și acrilamida se dezaminează cu formarea acizilor corespunzători (procesul este catalizat de lumină și baze). Dacă în soluția de acrilamidă conține acidul crilic duce se diminuează rezoluția și apar benzi difuze

Observații:

Acrilamida și bisacrilamida monomere sunt neurotoxine deosebit de puternice, se absorb prin piele și sunt suspicinate de a avea efecte cancerigene. Din acest motiv, manevrarea acestora se face cu atenție, purtând echipament de protecție. Poliacrilamida este considerată inofensivă dar totuși se recomandă utilizarea mănușilor la manipularea gelurilor din cauza resturilor de acrilamidă nepolimerizată.

Tampon TRIS 0,125 M, pH 6,8 – 1,5143 g Tris-bază se omogenizează în 80 mL apă distilată, se corectează pH-ul la 6,8 cu HCl și se aduce la volum de 100 mL cu apă distilată; soluția se păstrează în sticle bine închise, la temperatura camerei;

TEMED – N,N,N',N'- tetrametiletildiamină

Persulfat de amoniu 10% (APS) – se dizolvă 0,1 g persulfat de amoniu în 1 mL apă distilată; soluția se poate păstra la temperatura de rece (4°C) o săptămână; persulfatul de amoniu se descompune lent în soluție și din acest motiv se recomandă utilizarea soluției proaspăt preparate;

Soluție tampon de electroforeză Tris-Glicină-SDS (Tris-bază, 25 mM glicină 250 mM, SDS 0,1%) – se dizolvă 3,02 g Tris-bază, 18,8 g glicină, 10 mL SDS 10% în 1 L apă distilată; pentru cazul utilizării frecvente se pot prepara soluții de 10 ori mai concentrate care se vor dilua înainte de folosire

Observații

SDS-ul seste o pulbere fină, ușor antrenabilă de către curenții de aer Prin inhalare aceasta iritarea mucoasei nazale, și din acest motiv manipularea acesteia se face purtând masca de protecție.

Reducători: ditiotreitrol (DTT) sau β-mercaptoetanol (sau 2- mercaptoetanol);

Soluția tampon pentru probe Laemmli 2X conține: 4% SDS (pentru dizolvare completă se

încălzește soluția la 68°C), 20% glicerol, 10% β-mercaptoethanol, 0.004% albastru de bromfenol și 100 mL soluție 0.125 M Tris-HCl. Soluția se depozitează la -20°C.

Soluție pentru colorarea gelului: 0,25 g Comassie Brilliant Blue R250 se dizolvă în 100 ml amestec acid acetic:metanol:apă distilată 10:45:45 (v/v). Inițial, colorantul se dizolvă în metanol și apoi se adaugă acidul acetic și apa; Se poate folosi soluție de Comassie Brilliant Blue R-250 0,25% în isopropanol:acid acetic:apă 25:10:65 (v/v) ca soluție alternativă de colorare

Soluție pentru decolorarea gelului: soluție etanol:acid acetic:apă 10:10:80 (v/v)

Soluție pentru fixare: acid acetic 10%

Marker proteine

Sticlărie de laborator: pahare, pipete, vârfuri, tuburi Ependorf

Balanță analitică, agitator

Echipment individual de protecție: halat de laborator, mănuși, măști, ochelari de protecție

Mod de lucru (Mihășan și colab., 2012)

Reactivi și echipamente

Soluție tampon de electroforeză Tris-Glicină-SDS (Tris-bază, 25 mM glicină, SDS 0,1%) – se dizolvă 3,02 g Tris-bază, 18,8 g glicină, 10 mL SDS 10% în 1000 mL apă distilată; se pot prepara soluții de 10 ori mai concentrate în cazul utilizării frecvente care se diluează înainte de folosire

Soluția tampon pentru probe Laemmli 2X: (62.5 mM tris-HCl pH 6.8, 25% glycerol, 2% SDS, 0.01% bromophenol blue, 5% mercaptoethanol): 0.75 g Tris se dizolvă în 50 mL apă, se ajustează pH-ul la 6.8 cu HCl, se adaugă 25 mL glicerol, 2 g SDS, 10 mg albastru de bromfenol, și 5 mL mercaptoethanol și se aduce la volum de 1 L cu apă distilată

Soluție pentru fixare: acid acetic 10% (se introduce gelul în soluția de fixare pt. 30 de minute înainte de introducerea în soluția de colorare);

Soluție pentru colorarea gelului: 0,25 g Comassie Brilliant Blue R250 se dizolvă în 100 mL amestec metanol:acid acetic:apă distilată 45:10:45 (v/v). Inițial colorantul se dizolvă în metanol și apoi se adaugă acidul acetic și apa

Soluție pentru decolorarea gelului: soluție etanol:acid acetic:apă 10:10:80 (v/v)

Marker proteine

Extractia fracțiunilor proteice din grâu

(<https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103685>)

Etapa I. Extracția fracției albumine+globuline

O masa de 2 g de făină de grâu se amestecă cu 20 mL soluție NaCl 0,05 M și se omogenizează 1 oră. După centrifugare timp de 20 minute la 4000 x g, precipitatul se spală timp de 30 de minute cu 20 mL soluție NaCl 0.05 M, soluția de spălare conține fracția albumin+globuline.

Etapa II. Extracția gliadinei

Faza solidă rezultată de la Etapa I se tratează cu apă deionizată timp de 1 h, se centrifughează la 4000 x g timp de 20 de minute. Precipitatul se tratează cu 20 mL soluție alcool 70% (v/v) timp de 1 oră. După centrifugarea timp de 20 minute la 4000 x g, supernatantul conține gliadina.

Etapa III. Extracția gluteninei

Precipitatul rezultat de la extragerea gliadinei se tratează timp de 2 h cu 20 mL soluție SDS 2% și se centrifughează la 4000 x g timp de 20 minute. Supernatantul colectat este glutenina.

Electroforeza fracțiunilor proteice din grâu

SDS-PAGE glutenină

20 μ L soluție de glutenină se introduce într-un tub Ependorf și se adaugă 20 μ L soluție buffer pentru probe (soluție Laemmli 2X tampon pentru probe). Tubul se păstrează timp de 5 minute într-o baie de apă la 100°C. După centrifugare la 10.000 x g timp de 5 minute, proba este supusă electroforezei pe gel cu concentrația 5% la 20 mA timp de 1 h. După ce proba atinge gelul de concentrație 12%, electroforeza se va desfășura la curent de 50 mA timp de 3 ore.

Pentru fixare, se poate introduce gelul pt. 30 minute în soluție pentru fixare înainte de introducerea în soluția de colorare);

Pentru colorare se introduce gelul în soluția de colorare pt. 2 h.

Pentru decolorare, se introduce gelul în soluția de decolorare pt. 2h.

Dozarea conținutului proteic prin metoda Bradford

Principiul metodei

Metoda se are la bază proprietatea colorantului Brilliant Blue G-250 de a-și modifica spectrul de absorbție ca urmare a interacțiunii cu resturile de triptofan, tirozină, arginină, și fenilalanină din structura proteinelor. În forma sa liberă, colorantul are maximum de absorbție la 470 nm (maro), iar în urma interacțiunii cu proteinele acesta se modifică la 595 nm (albastru), intensitatea culorii fiind direct proporțională cu concentrația proteinelor.

Materiale și metode

Etanol 96 %

Acid fosforic 89 %

Reactiv Bradford: o cantitate de 10 mg colorant Brilliant Blue G-250 se dizolvă în 9,8 mL acid fosforic 89% și 10 mL etanol 96%, se aduce la volum de 100 mL cu apă distilată

NaOH 1 M (opțional): 4 g NaOH se dizolvă în apă distilată și se aduce la volum de 100 mL

Soluție standard albumină serică bovină (BSA) 0,05 mg/mL: 5 mg BSA se dizolvă în 50 mL apă distilată și se aduce la volum de 100 mL cu apă distilată; dizolvarea se face cu atenție deoarece există tendința de spumare

Spectrofotometru UV-VIS

Echipment de protecție: halat, mănuși, mască, etc.

Mod de lucru

1. 500 μ L probă (400 μ L în cazul folosirii soluției de NaOH), se introduc într-o eprubetă curată și uscată
2. Peste probă se pipetează un volum de 100 μ L NaOH 1 M, dacă este necesar (se evită formarea precipitatului în urma reacției dintre reactivul Bradford și extractul proteic și se solubilizează proteinele membranare)
3. Se adaugă peste probă apă distilată până la volumul final de 500 μ L
4. Se adaugă 1,5 mL reactiv Bradford și se omogenizează
5. După 5 minute se citește absorbanta soluției la 595 nm față de proba de control (proba se înlocuiește cu același volum de tampon de lucru); culoarea este stabilă, dar se recomandă ca citirea extincțiilor să se realizeze în cel mult 30 minute de la adăugarea reactivului Bradford
6. Se construiește dreapta de etalonare: se folosesc volumele de soluții standard de BSA 0,05 mg/mL și apă distilată conform Tabelului 12.6 și apoi se adaugă câte 1,5 mL reactiv

Bradford în fiecare; se agită puternic eprubetele, se lasă 5 minute la temperatura camerei, se citește extincția la 595 nm și se trasează dreapta de etalonare

Tabelul 12.6. Construirea curbei de etalonare prin metoda Bradford (Mihășan și colab., 2012)

BSA, μg (albumină serică bovină)	Soluție standard BSA 0,05 mg/mL, (μL)	Apă distilată (μL)
0,0	0	500
2,5	50	450
5	100	400
7,5	150	350
10	200	300
12,5	250	250
15,0	300	200
20,0	400	100

Micrometoda Bradford de dozare a proteinelor

Principiul metodei

Este o metodă care lucrează cu un volum mic de reacție (se poate lucra în microeprubete Eppendorf) cu dezavantajul unui interval de linearitate mai redus (2-20 μg).

Materiale și reactivi

Reactiv Bradford: se dizolvă 10 mg colorant Brilliant Blue G-250 în 9,8 mL acid fosforic 89 % și 10 mL etanol 96%, se aduce la volum de 100 mL cu apă distilată până la 100 mL; Soluția este stabilă câteva săptămâni dacă se păstrează la frigider în sticlă de culoare brună

NaOH 1 M

Microeprubete Eppendorf de 1,5 ml

Cuve cu volum mic pentru spectrofotometru

Soluție standard BSA 0,05 mg/mL

Spectrofotometru UV-VIS

Echipment de protecție: halat, mănuși, mască, etc.

Mod de lucru

1. Se pipetează într-un tub Eppendorf un volum de maxim 700 μL probă care conține 2-20 μg proteină; la volume mai mici de probă, se completează cu apă distilată până la 700 μL

2. Se adaugă peste probă 100 μL NaOH 1 M (doar dacă apare precipitat)
3. Se adaugă în amestecul de reacție 200 μL reactiv Bradford
4. Se omogenizează energic tubul, se menține timp de 5 minute la temperatura camerei și se citește extincția la 595 nm față de proba de control (proba se înlocuiește cu soluție de tampon de lucru)
5. Se construiește dreapta de etalonare folosind volume de soluție standard BSA 0,05 mg/ml și apă distilată (conform Tabelului 12.7); se adaugă în fiecare microeprubetă 200 μL reactiv Bradford și 100 μL soluție NaOH, se omogenizează energic și se menține 5 minute la temperatura camerei, se citesc extincțiile la 595 nm și se trasează dreapta de etalonare

Tabelul 12.7. Construirea curbei de etalonare prin metoda Bradford

(Mihășan și colab., 2012)

BSA, μg	Soluție standard BSA 0,05 mg/mL, (μL)	Apă distilată (μL)
0,0	0	700
2,5	50	650
5	100	600
7,5	150	550
10	200	500
12,5	250	450
15,0	300	400
20,0	400	300

13. DIALIZA

Aspecte generale

Dializa (terapie de substituție renală) este procesul de eliminare a compușilor toxici din sângele persoanelor al căror rinichi nu mai pot îndeplini natural aceste funcții. Dializa funcționează pe principiile difuziei componentilor din sânge printr-o membrană semipermeabilă (Figura 13.1). Sângele circulă pe o parte a unei membrane semi-permeabile, iar un lichid special de dializă (dializant) curge pe partea opusă. Apa în exces și compușii ale căror dimensiuni sunt mai mici decât porii membranei vor traversa membrana (uree, creatinină), în timp ce membrana blochează trecerea compușilor cu dimensiuni mai mari decât diametrul porilor (eritrocitele, proteinele mari).

Aparatură și reactivi

Ser de la persoane cu probleme renale recoltat prin proceduri standard

NaCl - solid

Tris solid (trisaminometan, trometamină, trometamol sau THAM) solid

HCl concentrat

NaOH

NaH₂PO₄·7H₂O - solid

Na₂HPO₄·H₂O - solid

Glicerol

EDTA - solid

DTT (dithiothreitol)

Tris-HCl (pH 6.8): 121,1 g Tris se dizolvă în 800 mL apă distilată, se ajustează pH-ul la 6.8. cu HCl și se aduce la volum de 1 L cu apă distilată

Soluție tampon fosfat pH 5.5: 800 mL apă distilată se amestecă cu 20.214 g NaH₂PO₄·7H₂O, 3.394 g Na₂HPO₄·H₂O, se corectează pH-ul (adăugare HCl sau NaOH) și se aduce la volum de 1 L cu apă distilată

Membrană de dializă cu cleme de închidere

Soluție tampon pentru dializă:

- soluție CAPD/DPCA 2 pentru dializă peritoneală

Pentru proteine:

- NaCl-150 mM, Tris-HCl-20mM, glycerol 20%

sau

- 50 mM Tris-Cl (pH 6.8), 100 mM NaCl, 1 mM DTT (dithiothreitol), 20% glycerol

Pentru creatină, creatinină, și acid uric:

- soluție tampon fosfat pH 5.5, 50 mM, cu 2% EDTA

Spectrofotometru UV-VIS

Standarde de calibrare pentru proteine, uree, creatinină, etc.

Sticlărie de laborator: pahare, pipete, vârfuri, tuburi Ependorf, vas cilindric de volum mare

Balanță analitică, agitator

Echipament individual de protecție

Mod de lucru

1. Se determină conținutul de proteine, uree, creatinină, etc. în soluția tampon inițială
2. Se pregătește membrana în conformitate cu instrucțiunile producătorului
3. Se încarcă proba în tubul format din membrana de dializă, nu mai mult de jumătate din capacitatea tubului și se închide tubul cu clema corespunzătoare, având grijă să se elimine bulele de aer; se cântărește tubul de dializă inițial;
4. Se introduce tubul de dializă încărcat în soluția tampon; pentru a nu exista erori semnificative induse de prelevarea de probe pentru analiză, volumul soluției tampon în care se introduce tubul de dializă trebuie să fie foarte mare (100:1)
5. Periodic, se prelevează probe din soluția tampon și se determină concentrațiile de proteine, uree, creatină, etc.
6. În momentele în care se face prelevarea probelor din soluția tampon, se poate cântări tubul de dializă, după o tamponare prealabilă cu un șervețel uscat, pentru a determina pierderea/creșterea în greutate pe durata dializei
7. La finalul dializei, se poate preleva probă din tubul de dializă și se analizează concentrațiile componentelor urmăriți

Interpretarea rezultatelor

Se analizează eficiența procesului de dializă în funcție de parametrii variați.

Observații:

Se pot modifica următorii parametri pentru a urmări influența lor asupra eficienței procesului de dializă:

1. Temperatura – experimentele se pot efectua la temperatura camerei sau la 4°C
2. Durata procesului de dializă fără a se schimba soluția tampon
3. Schimbarea soluției tampon – se imersează la fiecare 2 ore tubul de dializă în soluție tampon proaspătă
4. Diametrul porilor membranei
5. Efectuarea dializei în stare de repaos (fără agitarea soluției tampon) și cu agitare (agitarea soluției tampon).

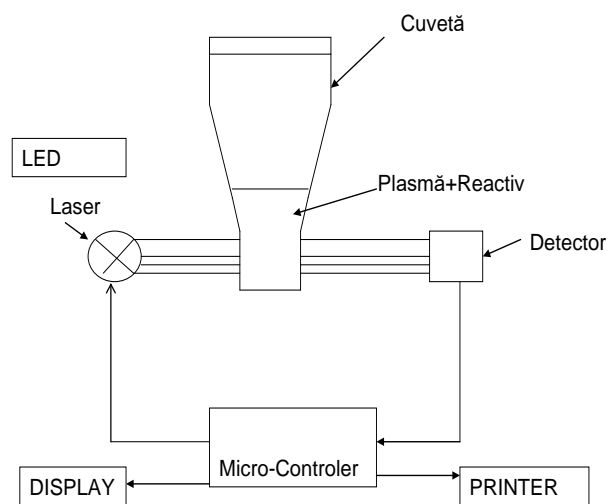
14. ANALIZE DE HEMOSTAZIE (COAGULARE)

Aspecte generale

Hemostazia este procesul biochimic prin care corpul este protejat de pierderea de sânge în urma penetrării vaselor de sânge.

Evaluarea hemostaziei se face analizând următorii parametrii: Timpul de protrombină (PT), Timpul de protrombină parțial activată (APTT), Timpul de trombină (TT), Fibrinogen (FIB), FaE (factori de coagulare extrinseci FII, FV, FVII, FX), FaI (factori de coagulare intrinseci FVIII, FIX, FXI, FXII), D-dimer. Măsurarea acestor parametrii se poate face cu fotometrul COATRON M1.

Fotometrul COATRON M1 este un fotometru unicanal care conține un LED optic care emite un fascicul de lumină cu lungimea de undă de 470 nm (Figura 14.1. A). Amestecul format din plasmă și reactivi absoarbe lumina transmisă, iar viteza de absorbție este calculată de un procesor și trimisă unui microcontroler pentru afișare/printare.



A – Schema funcțională a echipamentului
COATROM M1

B – Interfața de lucru a echipamentului
COATRON M1

Figura 14.1. Principiul de funcționare și suprafața de lucru a fotometrului COATRON M1
(COATRON M1 Operation Manual)

Din punct de vedere funcțional, coagulometrul COATRON M1 prezintă următoarele elemente (Figura 14.1.B):

Secțiunea butoanelor de operare: Afișajul – vizualizarea rezultatelor; Becul roșu – indică erori în funcționarea echipamentului; Becul verde – indică pregătirea echipamentului pentru măsurare; Meniul – folosit pentru calibrarea testelor; Săgețile – modificarea parametrilor; Enter – confirmă selectarea parametrilor selecționați; Timer – cronometru; Optic – activează sau oprește măsurătoare;

Secțiunea Reagent – două poziții care permit amplasarea a două tuburi cu reactiv, încălzite la 37°C;

Secțiunea Incubation- 6 poziții pentru eprubetele de lucru încălzite la 37°C;

Secțiunea Optic – secțiunea de măsurare, încălzită la 37°C.

Determinarea Timpului de Protrombină (PT, timp de coagulare, timp quick TQ)

Aspecte generale

Timpul de protrombină (PT) este o analiză de screening utilizată pentru monitorizarea terapiei anticoagulante orale cu antagoniști ai vitaminei K și la detectarea bolilor hemoragice dobândite sau moștenite. Timpul de coagulare măsoară calea hemostatică extrinsecă și depinde de activitatea factorilor coagulării II (Protrombina), V (Proaccelerina), VII (Proconvertina), X (Factorul Stuart) și fibrinogen (cf. Prospect – Prothrombin Time (PT), BioSystems, 2022).

Principiul metodei

Metoda are la bază măsurarea timpului de coagulare a probei de plasmă după adăugarea de trombină umană în prezență de CaCl₂ (cf. Prospect – Prothrombin Time (PT), BioSystems, 2022).

Aparatură și reactivi

- Sânge venos; se amestecă imediat 9 părți de sânge cu 1 parte anticoagulant (soluție bufer citrat de sodiu trihidrat 0,109 mol/L) și se omogenizează prin răsturnarea tubului; se centrifughează specimenul la 1500 x g rot/min pentru 15 minute pentru obținerea plasmei; se îndepărtează plasma din tub cu ajutorul unei seringi și se depozitează într-un tub de plastic;

plasma separată se analizează în maxim 2 ore, sau se depozitează prin congelare (se decongelează înainte de utilizare)

- Reactiv A: Tromboplastină tisulară derivată din creier de iepure cu stabilizatori; liofilizat; se prepară prin adăugarea de apă distilată și se omogenizează prin răsturnare, nu prin scuturare

- Reactiv B: Soluție tampon cu ioni de Ca^{2+} și azidă de sodiu cu rol de conservant

- Reactiv de lucru: se toarnă reactivul B în flaconul cu reactiv A și se amestecă prin rotire

- Plasma de Control pentru Coagulare nivel I (normal)

- Plasma de Control pentru Coagulare nivel II (patologic)

- Coagulometru

- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

1. Se pornește echipamentul prin presarea butonului ON și se așteaptă apariția culorii verzi la indicatorul "Ready" (Figura 14.2. A, B)

2. Se alege metoda de lucru prin apăsarea butonului "TEST" (se alege PT – Figura 14.2.B)

3. Reglarea factorului ISI: se presează opțiunea "MENU" și se reglează valoarea factorului ISI cu ajutorul săgeților, în conformitate cu valoarea prevăzută în fișa prevăzută în cutia cu reactivi (Anexa 15.1. Factorul ISI și construcția curbei de calibrare pentru determinarea Timpului de Protrombină (PT)); pentru cazul de față ISI = 1,25; se salvează modificarea apăsând butonul ENTER (Figura 14.2.C)

4. Construirea dreptei de calibrare: se introduc valorile pentru construcția dreptei de calibrare indicate în Anexa 15.1. Factorul ISI și construcția curbei de calibrare pentru determinarea Timpului de Protrombină (PT); în cazul de față se face calibrarea în trei puncte:

PT 100% - 12.1 s

PT 50% - 16.9 s

PT 25% - 26.6 s

Se salvează modificările prin apăsarea butonului "ENTER" (Figura 14.2.D, E, F).

5. Măsurarea Timpului de Protrombină (PT)

5.1. Se pipetează 50 μL probă de plasmă în eprubeta de testare și se pune în secțiunea "Reagent" pentru aducerea la temperatura camerei (Figura 14.2.G)

5.2. Se pipetează 100 μL Reactiv de lucru într-o eprubetă și se amplasează în secțiunea "Reagent" pentru aducerea la temperatura camerei (Figura 14.2.G)

5.3. Se transferă eprubetele cu proba de plasmă și reactivul de lucru în secțiunea “Incubation” și se lasă la incubat la 37°C timp de 2 minute; se cronometrează timpul prin apăsarea butonului “Timer” (Figura 14.2.H)

5.4. Se transferă eprubeta cu probă de plasmă în orificiul “Optic” și se apasă butonul “Optic” (Figura 14.2.I)

5.5. Când apare pe ecran mesajul “Active” (Figura 14.2.J) se pipetează 100 μ L reactiv de lucru încălzit și se lasă instrumentul să citească pornind simultan cronometrul (Figura 14.2.K)

5.6. Se citește timpul de coagulare afișat ecranul coagulometrului (Figura 14.2.L)



A



B



C



D



E



F



G



H



I

J

K

L

Figura 14.2. Operarea coagulometrului COATRON M1 pentru determinarea Timpului de Protrombină (PT)

Calculul rezultatelor

1) Timpul de protrombină (PT) se exprimă în secunde. Rezultatele pot avea valori variabile în funcție de țesutul de origine al tromboplastinei și de echipamentul folosit la analiză. Pentru a rezolva aceasta problemă, Comitetul Internațional de Standardizare în Hematologie și Comitetul Internațional de Tromboză și Hemostază recomandă raportarea rezultatelor PT la un *Indice Internațional de Sensibilitate (ISI) al Reactivului Tromboplastină folosită în analiză*, efectuat în raport cu *Tromboplastină de referință* pentru care se consideră $ISI = 1$ (cu cât valoarea ISI a Reactivului Tromboplastină folosit este mai apropiată de valoarea 1, cu atât reactivul este mai sensibil). În acest fel, rezultatele PT nu mai depind de reactivii folosiți.

Cunoscând valoarea ISI a Reactivului Tromboplastină folosit în analiză (prevăzut în fișa tehnică a reactivului), se calculează *Raportul Internațional Normalizat (INR)*, conform ecuației:

$$INR = \left[\frac{PT_{\text{probă}}}{PT_{\text{normal mediu}}} \right]^{ISI} \quad (14.1.)$$

unde:

$PT_{\text{probă}}$ – timpul de protrombină a probei de analizat, s

$PT_{\text{normal mediu}}$ – timpul de protrombină, s; $ISI = 1,25$ s (se extrage din fișa prezentă în cutia de reactivi; în cazul de față din Anexa 15.1);

2) Ca alternativă, PT poate fi exprimat procentual prin reprezentarea grafică a diferitelor valori (în %) a diluțiilor de calibrator pentru coagulare versus PT (în s). Procentul de PT prezent în probă este calculat prin interpolarea PT pe curba de calibrare.

Observații

- PT se utilizează la stabilirea intervalului terapeutic în tratamentele cu antagoniști ai vitaminei K, care prelungesc PT
- PT prelungit se poate datora și deficienței dobândite sau moștenite de factori ai coagulării I, II, V, VII, sau X, insuficienței hepatice, carenței de vitamina K și coagulării intravasculare diseminate.

Determinarea Timpului de Trombină (TT)

Aspecte generale

Măsurarea timpului de trombină (TT) este o altă analiză folosită la evaluarea formării fibrinei, la diagnosticarea tulburărilor de coagulare a sângelui și evaluarea eficienței terapiei fibrinolitice.

Principiul metodei

Metoda are la bază adăugarea de trombină umană în proba de plasmă de analizat și măsurarea duratei necesare formării cheagului de fibrină (cf. Prospect Thrombin Time (TT) – BioSystems, 2022).

Aparatură și reactivi

- Sânge venos; se amestecă 9 părți de sânge cu 1 parte anticoagulant (soluție bufer citrat de sodiu trihidrat 0,109 mol/L) și se omogenizează prin răsturnarea tubului; se centrifughează specimenul la 1500 x g rot/min pentru 15 minute pentru obținerea plasmei; se îndepărtează plasma din tub cu ajutorul unei seringi și se depozitează într-un tub de plastic; plasma separată se analizează în maxim 2 ore, sau se depozitează prin congelare (se decongelează înainte de utilizare)
- Reactiv A: Trombină umană în soluție tampon de calciu și stabilizator; liofilizat; se prepară prin adăugarea de apă distilată și se omogenizează prin răsturnare, nu prin scuturare
- Plasma de Control pentru Coagulare nivel I (normal)
- Plasma de Control pentru Coagulare nivel II (patologic)
- Coagulometru
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

1. **Se pornește** echipamentul prin presarea butonului ON și se așteaptă apariția culorii verzi la indicatorul “Ready” (Figura 14.3.A)

2. **Se alege metoda** de lucru prin apăsarea butonului “TEST” (se alege TT – Figura 14.3.B)

3. Măsurarea Timpului de Trombină (TT)

3.1. Se pipetează 100 μ L probă de plasmă în eprubeta de testare și se pune în secțiunea “Reagent” pentru aducerea la temperatura camerei

3.2. Se pipetează 100 μ L Reactiv de lucru într-o eprubetă și se amplasează în secțiunea “Reagent” pentru aducerea la temperatura camerei

3.3. Se transferă eprubetele cu proba de plasmă și reactiv A în secțiunea “Incubation” și se lasă la incubare la 37°C timp de 2 minute; se cronometrează timpul prin apăsarea butonului “Timer” (Figura 14.3.C)

3.4. Se transferă eprubeta cu probă de plasmă în orificiul “Optic” și se apasă butonul “Optic”

3.5. Când apare pe ecran mesajul “Active” (Figura 14.3.D) se pipetează 100 μ L reactiv de lucru încălzit și se lasă instrumentul să citească pornind simultan și cronometrul

3.6. Se citește timpul de coagulare afișat ecranul coagulometrului (Figura 14.3.E)



A



B



C



D



E

Figura 14.3. Operarea coagulometrului COATRON M1 pentru determinarea Timpului de Trombină (TT)

Calculul rezultatelor

TT se exprimă în secunde.

Valori orientative de referință

-sub 30 de secunde

-se poate exprima raportat la o valoare de referință, considerându-se semnificativă o diferență de 5 secunde între TT al probei pacientului și TT al probei de referință

Observații

TT depășește intervalul de referință în următoarele situații:

- anomalii ale fibrinogenului
- prezența antitrombinelor terapeutice (heparină, hirudnină, argatroban) sau anormale (proteine de mielom)

Determinarea Timpului de Tromboplastină Parțial Activată (APTT);

Timp de Cefalină Activator (TCA)

Aspecte generale

Timpul de Tromboplastină Parțial Activată (APTT) este o analiză de screening utilizată în principal la monitorizarea terapiei cu heparină. Timpul de coagulare măsoară calea hemostatică intrinsecă și depinde de activitatea factorilor coagulării I (Fibrinogen), II (Protrombină), V (Proaccelerină), VIII (Factor antihemolitic), IX (Factor Christmas), X (factor Stuart), XI

(Antecedentul Tromboplastinei Plasmatice, PTC), XII (factor Hageman), a lipidelor din trombocite și calciului (cf. Prospect Activated Partial Thromboplastin Time (APTT), BioSystems, 2022).

Principiul metodei

Metoda are la bază măsurarea timpului necesar formării cheagului de fibrină în proba de plasmă analizată ca rezultat a adăugării unei cantități standardizate de cefalină fosfolipidică, a calciului și a unui activator (siliciu micronizat) și calciului (cf. Prospect Activated Partial Thromboplastin Time (APTT), BioSystems, 2022).

Aparatură și reactivi

- Sânge venos; se amestecă 9 părți de sânge cu 1 parte anticoagulant (soluție bufer citrat de sodiu trihidrat 0,109 mol/L) și se omogenizează prin răsturnarea tubului; se centrifughează specimenul la 1500 x g rot/min pentru 15 minute pentru obținerea plasmei; se îndepărtează plasma din tub cu ajutorul unei seringi și se depozitează într-un tub de plastic; plasma separată se analizează în maxim 2 ore, sau se depozitează prin congelare (se decongelează înainte de utilizare)

- Reactiv A: Cefalină din creier de iepure și siliciu micronizat în soluție tampon cu stabilizant; liofilizat; se prepară prin adăugarea de apă distilată și se omogenizează prin răsturnare, nu prin scuturare

- Reactiv B: CaCl_2 0,025 mol/L în soluție tampon cu stabilizator

- Plasma de Control pentru Coagulare nivel I (normal)

- Plasma de Control pentru Coagulare nivel II (patologic)

- Coagulometru

- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

1. Se pornește echipamentul prin presarea butonului ON și se așteaptă apariția culorii verzi la indicatorul "Ready" (Figura 14.4.A)

2. Se alege metoda de lucru prin apăsarea butonului "Test" (se alege PATT – Figura 14.4.B)

3. Măsurarea Timpului de Timpului de Tromboplastină Parțial Activată (APTT);

3.1. Se pipetează 50 μL probă de plasmă în eprubeta de testare și se pune în secțiunea "Reagent" pentru aducerea la temperatura camerei

3.2. Se pipetează 50 μ L Reactiv A într-o eprubetă și se amplasează în secțiunea “Reagent” pentru aducerea la temperatura camerei

3.3. Se transferă eprubeta cu proba de plasmă în secțiunea “Incubation” (Figura 14.4.C) și se pipetează peste ea 50 μ L Reactiv A încălzit; se lasă la incubat la 37°C timp de 3 minute; se cronometrează timpul prin apăsarea butonului “Timer”

3.4. Se transferă eprubeta cu probă de plasmă și reactiv A în orificiul “Optic” și se apasă butonul “Optic”

3.5. Când apare pe ecran mesajul “Active” se pipetează 50 μ L reactiv B încălzit și se lasă instrumentul să citească pornind simultan și cronometrul (Figura 14.4.D)

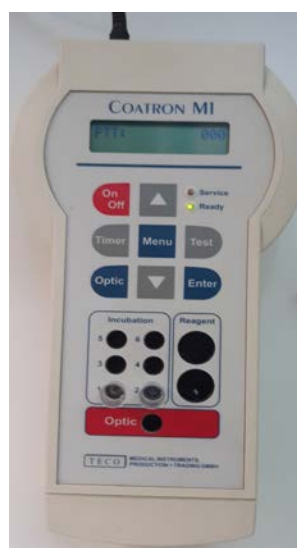
3.6. Se citește timpul de coagulare afișat ecranul coagulometrului (Figura 14.4.E)



A



B



C



D



E

Figura 14.4. Operarea coagulometrului COATRON M1 pentru determinarea Timpului de Tromboplastină Parțial Activată (APTT)

Calculul rezultatelor

- APTT se exprimă în general în secunde
- APTT se poate exprima și ca raport:

$$\frac{\text{APTT}_{\text{pacient}}}{\text{APTT}_{\text{plasmă normală}}} \quad (14.2.)$$

unde:

$\text{APTT}_{\text{plasmă normală}}$ – se determină în laborator pe plasmă normală.

Valori orientative de referință

- 25-43 secunde
- pentru kit-ul folosit valoarea APTT pentru plasmă normală este 34,70 s (Anexa 15.1.)

Observații

- APTT ridicate se poate datora deficienței dobândite sau moștenite a factorilor coagulării, bolilor hepatice, anticoagulantelor, terapiei orale cu heparină, sau inhibitori de trombină (hirudină, argatroban).

Determinarea Fibrinogenului (FIB) – Metoda Clauss

Aspecte generale

Fibrinogenul (Factor de coagulare I) este o glicoproteină solubilă în plasmă, cu greutatea de 340 kD, sintetizată în ficat, cu rol de precursor al fibrinei, prin acțiunea trombinei. Concentrația sa în plasmă variază între 2 și 4 g/L (cf. Prospect - Fibrinogen Clauss-BioSystems, 2002).

Principiul lucrării

Metoda Clauss de determinare a fibrinogenului măsoară vitezele de conversie a fibrinogenului în fibrină într-o plasmă diluată, în prezența unui exces de trombină. Timpul de coagulare măsurat este invers proporțional cu concentrația de fibrinogen (cf. Prospect - Fibrinogen Clauss-BioSystems, 2002).

Aparatură și reactivi

- Sânge venos; se amestecă 9 părți de sânge cu 1 parte anticoagulant (soluție bufer citrat de sodiu trihidrat 0,109 mol/L) și se omogenizează prin răsturnarea tubului; se centrifughează specimenul la 1500 x g rot/min pentru 15 minute pentru obținerea plasmei; se îndepărtează plasma din tub cu ajutorul unei seringi și se depozitează într-un tub de plastic; plasma separată se analizează în maxim 2 ore, sau se depozitează prin congelare

- Reactiv A: Alfatrombină umană înalt purificată în soluție tampon cu calciu și stabilizator; liofilizat; se prepară prin adăugarea de apă distilată și se omogenizează prin răsturnare, nu prin scuturare; probele de plasmă se diluează 1/10 cu reactiv B (1 parte probă + 9 părți reactiv B); ex. 50 μL probă de plasmă + 450 μL reactiv B

- Reactiv B: Soluție tampon imidazol cu stabilizator
- Plasma de Control pentru Coagulare nivel I (normal)
- Plasma de Control pentru Coagulare nivel II (patologic)
- Calibrator Coagulare
- Coagulometru
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru

1. Se pornește echipamentul prin presarea butonului ON și se așteaptă apariția culorii verzi la indicatorul "Ready" (Figura 14.5.A)

2. Se alege metoda de lucru prin apăsarea butonului "Test" (se alege FIB – Figura 14.5.B)

3. Construcția curbei de calibrare

3.1. Se folosește Calibratorul de Coagulare pentru a prepara soluții etalon 1/1, 1/5, 1/10, 1/20 și 1/40 cu Reactivul B; pentru fiecare soluție în parte se parcurg pe rând etapele 3.2-3.8 folosind reactiv B în loc de reactiv A

3.2. Se pipetează 100 μL soluție etalon în eprubeta de testare

3.3. Se pipetează 250 μL reactiv A într-o eprubetă

3.4. Se introduc eprubetele cu soluție etalon și reactiv A în secțiunea "Incubation" la încălzire

3.5. Se incubează eprubetele cu soluție talon și reactiv A la 37°C timp de 2 minute; se cronometrează timpul prin apăsarea butonului "Timer"

3.6. Se transferă eprubeta cu soluție etalon în orificiul "Optic" și se apasă butonul "Optic"

3.7. Când apare pe ecran mesajul “Active” se pipetează 50 μ L reactiv A încălzit în eprubeta cu soluție etalon și se lasă echipamentul să citească pornind simultan și cronometrul

3.8. Se citește timpul de coagulare afișat pe ecranul coagulometrului

3.9. Se reprezintă grafic Concentrațiile soluțiilor etalon (g/L) versus timpul de coagulare (s).

4. Ca alternativă la construcția curbei de calibrare, se poate folosi curba de calibrare prevăzută în Kit.

5. Determinarea Fibrinogenului – Clauss

5.1. Se pipetează 100 μ L probă de plasmă diluată 1/10 cu reactiv B în eprubeta de testare și se pune în secțiunea “Reagent” pentru aducerea la temperatura camerei

5.2. Se pipetează 50 μ L Reactiv A într-o eprubetă și se amplasează în secțiunea “Reagent” pentru aducerea la temperatura camerei

5.3. Se transferă eprubetele cu proba de plasmă diluată și reactiv A în secțiunea “Incubation”; se lasă la incubat la 37°C timp de 2 minute; se cronometrează timpul prin apăsarea butonului “Timer” (Figura 14.5.C)

5.4. Se transferă eprubeta cu proba de plasmă diluată în orificiul “Optic” și se apasă butonul “Optic”

5.5. Când apare pe ecran mesajul “Active” se pipetează 50 μ L reactiv A încălzit și se lasă instrumentul să citească pornind simultan și cronometrul (Figura 14.5.D)

5.6. Se citește timpul de coagulare afișat ecranul coagulometrului (Figura 14.5.E)



A



B



C



D



E

Figura 14.5. Operarea coagulometrului COATRON M1 pentru determinarea Fibrinogenului Clauss (FIB)

Calculul rezultatelor

Concentrația de fibrinogen din proba de plasmă se calculează prin interpolarea timpului de coagulare citit pe curba de calibrare (construită sau preluată din fișa tehnică a kit-ului) și se înmulțește cu 10 (factorul de diluție al probei).

Dacă concentrația de fibrinogen este < 1 g/L, probele trebuie diluate în proporție de 1/5 cu reactiv B și reanalizate.

Valori orientative de referință

-2,0 – 4,0 g/L

Observații

Niveluri ridicate de fibrinogen apar în bolile arterelor coronare, bolile cerebrovasculare.

Nivelurile scăzute de fibrinogen sunt asociate bolilor hepatice (ciroză, icter) sau cu fibrinoliză și coagulare intravasculară diseminată.

15. ELEMENTE DE HEMATOLOGIE

Analiza hematologică are ca scop evaluarea componentelor celulare ale sângelui.

Clasificarea și măsurarea celulelor sanguine folosind Analizorul Automat de Hematologie - Rayto - RT-7600

Principiul metodei

Analizorul folosește principiul impedanței (colorimetric pentru măsurarea hemoglobinei) pentru a clasifica și număra celulele sanguine (Manual RT-6700). Principiul impedanței volumetrică a fost brevetat în 1953 de Wallace Coulter și este considerat cea mai veche metodă automată de numărare a celulelor sanguine. Principiul utilizează două camere, fiecare conținând câte un electrod, separate printr-o deschidere mică, rotundă, care permite trecerea doar a câte unei singure celule. Ambele camere conțin o soluție conductivă și un curent constant, de intensitate scăzută se deplasează între electrozi. În sere de repaus, ambele camere sunt la presiune egală ceea ce nu modifică impedanța. Pentru a începe numărarea celulelor, proba este mai întâi amestecată cu un diluant (de obicei, aceeași soluție conductivă deja în fiecare cameră) și introdusă într-o cameră, în timp ce în cealaltă cameră se asigură vidarea. Din cauza diferenței de presiune dintre cele două camere, amestecul de fluid conductor și sânge începe să curgă prin deschidere dinspre camera aflată la presiune normală spre cea aflată în vid. Deoarece camera este traversată de curent, pe măsură ce fiecare celulă trece prin deschidere, se observă o ușoară modificare a conductibilității. Deoarece celulele roșii, celulele albe și plachetele sanguine au dimensiuni diferite, fiecare celulă care trece prin deschidere creează un vârf cu o amplitudine diferită. Prin măsurarea amplitudinii și determinarea ferestrelor de măsurare a tensiunii, celulele de dimensiuni diferite sunt identificate și numărate pe măsură ce trec prin deschidere. Având în vedere un volum cunoscut constant de sânge și diluanți, este ușor de calculat numărul de celule diferite pe microlitru (milimetru cub) de sânge integral. În plus, folosind tehnologia microcomputerului încorporat, sunt calculați și raportați și alți parametri ai sângelui. Metodologia prevede adăugarea unui agent de lizare pentru a îndepărta celulele roșii și a evita interferența acestora în cuantificarea numărului de celule albe. În cazul hemoglobinei, prin adăugarea agentului de lizare, aceasta va fi convertită la SLS-hemoglobină a cărei concentrație

este măsurată colorimetric pe baza absorbăței luminii și calculată prin comparare cu absorbăța diluantului măsurată înainte de adăugarea probei.

Rezultatele sunt exprimate sub formă tabelară și ca histograme. Histogramele sunt reprezentări grafice OXY ale populațiilor de celule din sânge (Figura 15.1). Într-o histogramă se reprezintă pe axa OX dimensiunea celulelor iar pe axa OY numărul lor relativ. Tipurile de celule sunt separate în funcție de dimensiunea lor, fiecare vârf reprezentând un anumit tip de celule. Aria de sub fiecare curbă este proporțională cu numărul relativ al celulelor din probe.

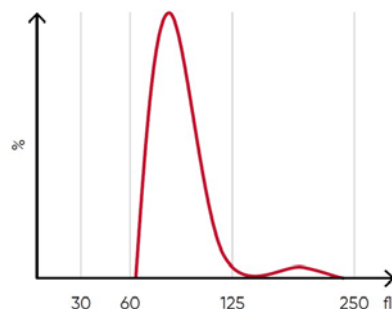


Figura 15.1. Structura unei histograme

(<https://boule.com/news/understanding-blood-cell-histograms/>)

Aparatură și reactivi

- Probe de sânge recoltate conform procedurilor standard: (i) sânge venos colectat în vacutainere cu anticoagulant; (ii) sânge periferic recoltat din partea interioară a degetului mijlociu sau vârful degetului inelar în cazul adulților, din degetul mijlociu pentru copiii peste 6 luni sau din degetul mare sau partea superioară a tălpii pentru copii sub 6 luni; (iii) sânge integral; probele de sânge se omogenizează prin răsturnare și rotire timp de 3-5 minute;

- Analizorul Automat de Hematologie - RT-7600
- Lizant (lyse)
- Cleaner
- Soluție de diluare
- Sticlărie de laborator

Mod de lucru (Figura 15.2)



Figura 15.2. Modul de lucru cu analizorul automat de hematologie Rayto - RT-7600

1. Se pornește analizorul (15.2.a); acesta verifică starea componentelor, își transferă parametrii necesari și efectuează teste blank pentru WBC (număr leucocite), RBC (număr eritrocite - hematii), HGB (conținut hemoglobină), HCT (hematocrit) și PLT (număr trombocite – plachete sanguine); rezultatele sunt afișate în fereastra de testare probe din Figura 15.2.b;

2. Editarea datelor probelor care vor fi supuse analizei (15.2.c): cu ajutorului tastaturii virtuale se introduc informații legate de probele supuse analizei: numărul probei, sexul și vârsta pacientului, tipul probei de sânge (integral, periferic cu anticoagulant, periferic prediluat), referința (se aleg valorile de referință în funcție de datele pacientului), nr. de înregistrare medicală a pacientului, patul din salonul în care este internat pacientul, departamentul care a trimis proba, persoana care a trimis proba, persoana care a lucrat proba;

Observații: după selectarea tipului de sânge periferic prediluat, se pun 20 μL sânge periferic în cupa de diluție, și se apasă butonul "Diluent" și va apărea mesajul din Figura 15.2.d. Se introduce cupa sub acul de absorbție, se apasă tasta de aspirație, analizorul va adăuga 700 μL în cupa de diluție și va aspira 300 μL probă diluată (Figura 15.2.e).

3. Testarea probelor – proba de analizat se așează sub acul de absorbție, se apasă tasta de aspirație și se menține până la retragerea acului în interiorul aparatului; echipamentul începe analiza probei, pe durata analizei pe ecran apare mesajul "Being tested...", iar la final se afișează rezultatele testului sub forma unui tabel și histograma (Figura 15.2.f, g); rezultatele pot fi printate prin selectarea opțiunii "Print instantly";

Elementele testate sunt indicate în Tabelul 15.1.

Tabelul 15.1. Elementele testate de Analizorul Automat de Hematologie – Rayto - RT-7600

Denumire în limba engleză	Denumire în limba română	Abreviere parametru	Unitate de măsură (implicită)
White blood cell count	Număr de leucocite	WBC	$10^9/\text{L}$
Lymphocyte count	Număr limfocite	LYM#	$10^9/\text{L}$
Intermediate cell count	Număr celule intermediare	MID#	$10^9/\text{L}$
Granulocyte cell count	Granulocite	GRA#	$10^9/\text{L}$
Lymphocyte percentage	Procent limfocite	LYM%	%
Intermediate cells percentage	Procent celule intermediare	MID%	%
Granulocyte cell percentage	Procent granulocite	GRA%	%
Red blood cell count	Număr eritrocite (hematii)	RBC	$10^{12}/\text{L}$
Hemoglobin content	Conținut hemoglobină	HGB	g/L
Hematocrit	Hematocrit	HCT	%
Mean corpuscular volume	Volum mediu eritrocitar	MCV	fL
Mean corpuscular hemoglobin	Hemoglobina medie eritrocitară	MCH	Pg
Mean corpuscular hemoglobin concentration	Concentrația medie de hemoglobină eritrocitară	MCHC	g/L
Red cell distribution width SD	Distribuția hematiilor (val. absolută)	RDW-SD	fL

Red cell distribution width CV	Distribuția hematiilor (%)	RDW-CV	%
Platelet count	Trombocite (plachete sanguine)	PLT	10 ⁹ /L
Mean platelet volume	Volum mediu trombocitar	MPV	fL
Platelet distribution width	Distribuția plachetelor sanguine	PDW	%
Plateletcrit	Trombocrit (plachetocrit)	PCT	%
Platelet-large cell ratio	Procentul de macrotrombocite	P-LCR	%
White blood cell histogram	Histogramă leucocite	WBC histogramă	
Red blood cell histogram	Histogramă eritrocite	RBC histogramă	

Interpretarea rezultatelor

A. Mesaje de atenționare a parametrilor din tabelul cu rezultate

În tabel pot apărea mesaje de atenționare cu privire la parametrii probei:

H + -> rezultatul parametrului respectiv este mai mare decât maximul valorii patologice predeterminate

L - -> rezultatul parametrului respectiv este mai mic decât minimul valorii patologice predeterminate

H: -> rezultatul parametrului respectiv este mai mic sau egal cu valoarea patologică maximă, mai mare decât decât maximul valorii normale

L: -> rezultatul parametrului respectiv este mai mare sau egal cu minimul valorii patologice, mai mic decât minimul valorii normale

B. Mesaje de atenționare a histogramelor

LF1 -> regiunea din partea stângă a vârfului limfocitelor este anormală, cauzele posibile fiind: coagularea trombocitelor, trombocite gigant, plasmodium, eritrocite nucleate, eritrocite nelizate, limfocite anormale, crioglobuline;

LF2 -> vârful limfocitelor și regiunea de celule intermediare sunt anormale, printre cauzele posibile numărându-se: limfocite heteromorfe, celule plasmaticice, celule atipice, celule incipiente, populații de eosinofile și bazofile;

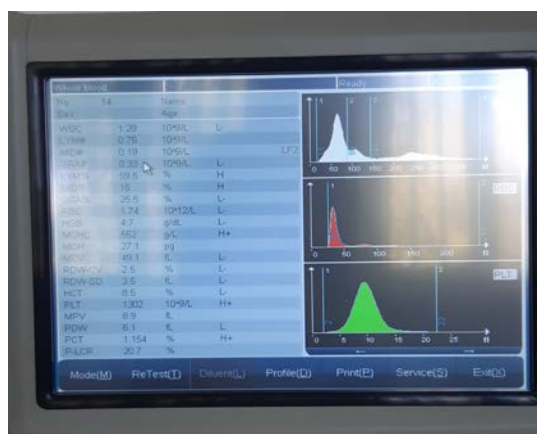
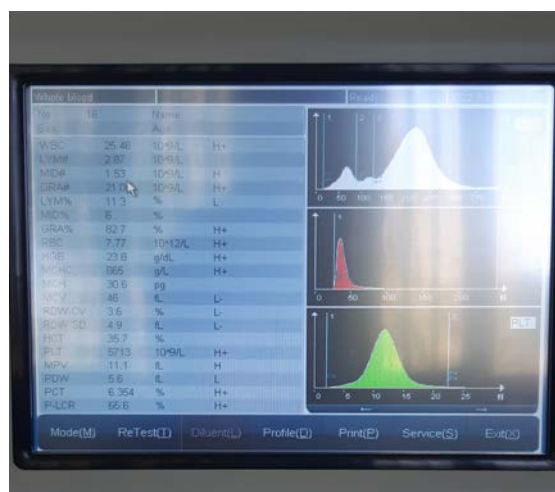
LF3 -> regiunea dintre zona celulelor intermediare și vârful neutrofil este anormală, printre cauzele posibile fiind: granulocite imature, celule anormale, eosinofiles

LF4 -> regiunea din partea dreaptă a neutrofilelor este anormală, o posibilă cauză fiind granulocitoza;

PF1 -> regiunea din partea dreaptă a trombocitelor este anormală, indicând existența probabilă a: trombocite mari, agregat trombocite, celule roșii mici, fragmente de celule și proteine firboase;

PF2 -> regiunea din partea stângă a tromboxitelor este anormală, indicând existența probabilă a: fragmentelor de trombocite mici, masa eritrocitară inclusă și zgomot electronic de interferență;





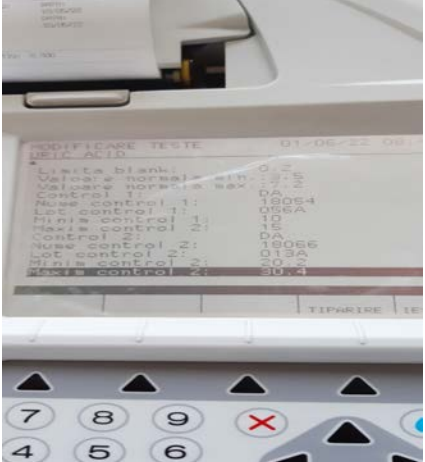
Tabelul 15.2. Exemple de histograme









ANEXE

Anexa 3.1. Exemplificare de folosire a spectrofotometrului BioSystems BTS-350 pentru analiza conținutului de acid uric urinar

B.1. Introducerea/Verificarea metodei de analiză

		
<p>a. Pornire spectrofotometru</p>	<p>b. Selectare opțiune „PROGRAMARE“</p>	<p>c. Selectare opțiune „TESTE“</p>
		
<p>d. Selectare metodă de analiză – ACID URIC</p>	<p>e. Introducere limite de control acid uric</p> <p>Anexa 3.2. Urină de control biochimică nivel I (normal): min. 10,0 mg/dL; max. 15,0 mg/dL</p> <p>Anexa 3.3. Urină de control biochimică nivel II (patologic): min: 20,2 mg/dL; max: 30,4 mg/dL</p>	

B.2. Analiza acidului uric în probele de urină

 <p>f. Revenire la meniul principal și selectarea opțiunii „CONCENTRAȚII”</p>	 <p>g. Selectare metoda de analiza- Acid uric</p>	 <p>h. Inserare capilar alimentare în apă distilată pt. stabilirea liniei de bază (0 optic)</p>
<p>i. Activare analiză Blank și introducere capilar de alimentare în eprubeta Blank</p>	<p>j. Activare analiză Standard și introducere capilar de alimentare în eprubeta Standard</p>	 <p>k. Activare analiză Probă și introducere capilar de alimentare în eprubeta Control I</p>
 <p>l. Activare analiză Probă și introducere capilar de alimentare în eprubeta Control II</p>	 <p>m. Activare analiză Probă și introducere capilar de alimentare în eprubeta Probă</p>	

Anexa 3.2. Limite componente Urină de control biochimică Nivel I (normal)



BIOCHEMISTRY CONTROL URINE

LEVEL: **I**LOT: **036**

ENGLISH						
COMPONENT	METHOD	VALUE	RANGE	1s	UNITS	TRACEABILITY
ALBUMIN	Turbidimetry	23,1	18,5 - 27,7	1,5	mg/L	ERM-DA470/IFCC (IRMM)
α-AMYLASE	IFCC	216	173 - 259	14	U/L	C-RSE/IFCC,
		3,58	2,88 - 4,30	0,24	μkat/L	IRMM/IFCC-456 (IRMM)
	Direct substrate	239	191 - 287	16	U/L	BMC
		3,97	3,18 - 4,76	0,26	μkat/L	
α-AMYLASE PANCREATIC	Immunoinhibition	179	143 - 215	12	U/L	C-RSE/IFCC,
		2,97	2,38 - 3,56	0,20	μkat/L	BMC
CALCIUM	o-Cresolphthalein	9,09	8,00 - 10,18	0,36	mg/dL	SRM 956 (NIST)
		2,27	2,00 - 2,54	0,09	mmol/L	
CHLORIDE	Selective electrode	106	95 - 117	4	mmol/L	SRM 956 (NIST)
CITRATE	Citrate Lyase/Malate Dehydrogenase	33,3	27,3 - 39,3	2,0	mg/dL	Aqueous
		1,73	1,42 - 2,04	0,10	mmol/L	primary standard
CREATININE	Jaffé & enzymatic	74,3	59,4 - 89,2	5,0	mg/dL	SRM 967 (NIST)
		6578	5262 - 7894	439	μmol/L	
GLUCOSE	Hexokinase	25,0	20,0 - 30,0	1,7	mg/dL	SRM 965 (NIST)
		1,39	1,11 - 1,67	0,09	mmol/L	
MAGNESIUM	Xylyl Blue	4,45	3,56 - 5,34	0,30	mg/dL	SRM 956 (NIST)
		1,92	1,48 - 2,18	0,12	mmol/L	
PHOSPHORUS	Phosphomolybdate/UV	34,2	27,4 - 41,0	2,3	mg/dL	BMC
		11,0	8,8 - 13,2	0,7	mmol/L	
POTASSIUM	Selective electrode	44,4	40,0 - 48,8	1,5	mmol/L	SRM 956 (NIST)
PROTEIN URINE	Pyrogallol Red	170	138 - 204	11	mg/L	SRM 927 (NIST)
SODIUM	Selective electrode	86,0	77,4 - 94,6	2,9	mmol/L	SRM 956 (NIST)
UREA/BUN	Urease (Color/UV)	1155	924 - 1386	77	mg/dL	SRM 909 (NIST)
		192	154 - 230	13	mmol/L	
URIC ACID	Uricase/peroxidase	12,5	10,0 - 15,0	0,8	mg/dL	SRM 909 (NIST)
		743	594 - 892	50	μmol/L	

NOTES

The enzymes values (U/L and μkat/L) are for a incubation temperature of 37 °C.

BMC: BioSystems master calibrator.

C-RSE/IFCC: Traceable to the reference system as described by the IFCC Committee on Reference Systems for Enzymes.

Anexa 3.3. Limite componente Urină de control biochimică Nivel II (patologic)



BIOCHEMISTRY CONTROL URINE

LEVEL: **II**LOT: **022**

ENGLISH

COMPONENT	METHOD	VALUE	RANGE	1s	UNITS	TRACEABILITY
ALBUMIN	Turbidimetry	103	82 - 124	7	mg/L	ERM-DA4/01FCC (IRMM)
α-AMYLASE	IFCC	716 11,9	573 - 859 9,5 - 14,3	48 0,8	U/L µkat/L	C-RSE/IFCC, IRMM/IFCC-456 (IRMM)
	Direct substrate	784 13,0	627 - 941 10,4 - 15,6	52 0,9	U/L µkat/L	BMC
	Immunoinhibition	640 10,6	512 - 768 8,5 - 12,7	43 0,7	U/L µkat/L	C-RSE/IFCC, BMC
α-AMYLASE PANCREATIC	Immunoinhibition	15,1	13,3 - 16,9	0,6	mg/dL	SRM 956 (NIST)
CALCIUM	o-Cresolphthalein	3,78	3,33 - 4,23	0,15	mmol/L	SRM 956 (NIST)
CHLORIDE	Selective electrode	150	135 - 165	5	mmol/L	SRM 956 (NIST)
CITRATE	Citrate Lyase/Malate Dehydrogenase	78,3	64,2 - 92,4	4,7	mg/dL	Aqueous primary standard
		4,07	3,34 - 4,80	0,24	mmol/L	
CREATININE	Jaffé & enzymatic	178 15781	142 - 214 12625 - 18937	12 1052	mg/dL µmol/L	SRM 967 (NIST)
GLUCOSE	Hexokinase	252 14,0	202 - 302 11,2 - 16,8	17 0,9	mg/dL mmol/L	SRM 965 (NIST)
MAGNESIUM	Xylyl Blue	12,5 5,14	10,0 - 15,0 4,11 - 6,17	0,8 0,34	mg/dL mmol/L	SRM 956 (NIST)
PHOSPHORUS	Phosphomolybdate/UV	72,1	57,7 - 86,5	4,8	mg/dL	BMC
		23,2	18,6 - 27,8	1,5	mmol/L	
POTASSIUM	Selective electrode	82,9	74,6 - 91,2	2,8	mmol/L	SRM 956 (NIST)
PROTEIN URINE	Pyrogallol Red	1293	1034 - 1552	86	mg/L	SRM 927 (NIST)
SODIUM	Selective electrode	157	141 - 173	5	mmol/L	SRM 956 (NIST)
UREA/BUN	Urease (Color/UV)	1622	1298 - 1946	108	mg/dL	SRM 909 (NIST)
		269	215 - 323	18	mmol/L	
URIC ACID	Uricase/peroxidase	25,3	20,2 - 30,4	1,7	mg/dL	SRM 909 (NIST)
		1508	1206 - 1810	101	µmol/L	

NOTES

The enzymes values (U/L and µkat/L) are for a incubation temperature of 37 °C.

BMC: BioSystems master calibrator.

C-RSE/IFCC: Traceable to the reference system as described by the IFCC Committee on Reference Systems for Enzymes.

Anexa 3.4. Limite componente Ser de Control Biochimic

Nivel I (normal)

BIOCHEMISTRY CONTROL SERUM

(HUMAN)

LEVEL: LOT:

COMPONENT	METHOD	VALUE	RANGE	IS	UNITS	TRACEABILITY
ACE	FAPGG	23,4	14,0 - 32,8	3,1	U/L	BMC
		0,389	0,233 - 0,545	0,052	μkat/L	
ACID PHOSPHATASE	Naphthyl phosphate/pentanediol	6,91	3,46 - 10,37	1,15	U/L	BMC
		0,115	0,058 - 0,173	0,019	μkat/L	
ALBUMIN	Bromocresol green	38,1	31,2 - 45,0	2,3	g/L	ERM-DA470/IFCC (IRMM)
ALKALINE PHOSPHATASE	2-Amino-2-methyl-1-propanol buffer	125	103 - 148	8	U/L	C-RSE/IFCC
		2,08	1,71 - 2,45	0,12	μkat/L	BMC
	Diethanolamine buffer	185	152 - 218	11	U/L	BMC
ALT/GPT	IFCC without pyridoxal phosphate	3,07	2,52 - 3,62	0,18	μkat/L	BMC
		44,0	35,2 - 52,8	2,9	U/L	
a-AMYLASE	IFCC	0,731	0,585 - 0,877	0,049	μkat/L	C-RSE/IFCC
		45,7	36,6 - 54,8	3,0	U/L	ERM-AD454/IFCC (IRMM)
	0,758	0,606 - 0,910	0,051	μkat/L	IRMM/IFCC-456 (IRMM)	
a-AMYLASE PANCREATIC	Immunoinhibition	105	86 - 124	6	U/L	C-RSE/IFCC
		1,74	1,43 - 2,05	0,10	μkat/L	IRMM/IFCC-456 (IRMM)
		106	87 - 125	6	U/L	BMC
AST/GOT	IFCC without pyridoxal phosphate	1,76	1,44 - 2,08	0,11	μkat/L	BMC
		72,0	59,0 - 85,0	4,3	U/L	
BILIRUBIN, DIRECT	Diazotized sulfanilic	1,20	0,98 - 1,42	0,07	μkat/L	C-RSE/IFCC
		44,4	35,5 - 53,3	3,0	U/L	BMC
		0,736	0,589 - 0,883	0,049	μkat/L	ERM-AD457/IFCC (IRMM)
BILIRUBIN, TOTAL	Diazotized sulfanilic / Dichlorophenyl diazonium	43,8	35,0 - 52,6	2,9	U/L	C-RSE/IFCC
		0,728	0,582 - 0,874	0,049	μkat/L	ERM-AD457/IFCC (IRMM)
		0,309	0,216 - 0,402	0,031	mg/dL	BMC
		5,28	3,70 - 6,86	0,53	μmol/L	
BILIRUBIN, TOTAL	Diazotized sulfanilic / Dichlorophenyl diazonium	0,363	0,254 - 0,472	0,036	mg/dL	BMC
		6,21	4,35 - 8,07	0,62	μmol/L	
		0,363	0,254 - 0,472	0,036	mg/dL	BMC
CALCIUM	MTB / o-cresolphthalein	6,21	4,35 - 8,07	0,62	μmol/L	SRM 916 (NIST)
		0,851	0,698 - 1,004	0,051	mg/dL	
CHOLESTEROL	Cholesterol oxidase/peroxidase	14,5	11,9 - 17,1	0,9	μmol/L	SRM 956 (NIST)
		11,0	9,7 - 12,3	0,4	mg/dL	
		2,74	2,41 - 3,07	0,11	mmol/L	
CHOLESTEROL HDL	Direct detergent	11,0	9,7 - 12,3	0,4	mg/dL	SRM 956 (NIST)
		2,74	2,41 - 3,07	0,11	mmol/L	
CHOLESTEROL HDL	Phosphotungstate/Mg - Cholesterol oxidase/peroxidase	11,0	9,7 - 12,3	0,4	mg/dL	SRM 956 (NIST)
		2,74	2,41 - 3,07	0,11	mmol/L	
CHOLESTEROL LDL	Direct detergent	87,4	78,7 - 96,1	2,9	mmol/L	SRM 956 (NIST)
		151	128 - 174	8	mg/dL	
CHOLESTEROL HDL	Direct detergent	3,92	3,33 - 4,51	0,20	mmol/L	SRM 909 (NIST)
		53,6	40,2 - 67,0	4,5	mg/dL	
CHOLESTEROL HDL	Phosphotungstate/Mg - Cholesterol oxidase/peroxidase	1,39	1,04 - 1,74	0,12	mmol/L	BMC
		**	** - **	**	mg/dL	
CHOLESTEROL LDL	Direct detergent	**	** - **	**	mmol/L	SRM 909 (NIST)
		65,0	48,8 - 81,3	5,4	mg/dL	
CHOLESTEROL HDL	Direct detergent	1,68	1,26 - 2,10	0,14	mmol/L	CDC Reference Method
		1,39	1,04 - 1,74	0,12	mmol/L	
CHOLESTEROL LDL	Direct detergent	1,68	1,26 - 2,10	0,14	mmol/L	BMC
		6062	4547 - 7578	505	U/L	
CHOLINESTERASE	Butyrylthiocholine	101	76 - 126	8	μkat/L	BMC
		173	138 - 208	12	U/L	
CK	IFCC	2,87	2,30 - 3,44	0,19	μkat/L	C-RSE/IFCC
		94,1	70,6 - 117,6	7,8	μg/dL	ERM-AD455/IFCC (IRMM)
COPPER-PAESA	3,5-DiBr-PAESA	14,8	11,1 - 18,5	1,2	μmol/L	BMC
		1,18	0,97 - 1,39	0,07	mg/dL	
CREATININE	Enzymatic	105	86 - 124	6	μmol/L	SRM 967 (NIST)
		1,21	0,99 - 1,43	0,07	mg/dL	
	Jaffé compensated	107	88 - 126	6	μmol/L	SRM 967 (NIST)
	Jaffé non compensated	1,33	1,09 - 1,57	0,08	mg/dL	
	117	96 - 138	7	μmol/L	SRM 909 (NIST)	

BIOCHEMISTRY CONTROL SERUM

(HUMAN)

LEVEL: LOT:

COMPONENT	METHOD	VALUE	RANGE	IS	UNITS	TRACEABILITY
GLUCOSE	Glucose oxidase/peroxidase Hexokinase	86,5	73,5 - 99,5	4,3	mg/dL	SRM 965 (NIST)
		4,80	4,08 - 5,52	0,24	mmol/L	
g-GT	IFCC	38,5	31,6 - 45,4	2,3	U/L	C-RSE/IFCC ERM-AD452/IFCC (IRMM)
		0,639	0,524 - 0,754	0,038	μkat/L	
beta-HYDROXYBUTYRATE	Hydroxybutyrate dehydrogenase/diaphorase	3,24	2,66 - 3,82	0,19	mg/dL	BMC
		0,314	0,257 - 0,371	0,019	mmol/L	
IRON	Ferrozine	94,6	78,0 - 111,2	5,5	μg/dL	BMC
		16,9	13,9 - 19,9	1,0	μmol/L	
	Chromazurol B	114	94 - 134	7	μg/dL	BMC
LACTATE	LOD/POD	20,5	16,9 - 24,1	1,2	μmol/L	BMC
		42,9	35,2 - 50,6	2,6	mg/dL	
LIPASE	Color	4,77	3,91 - 5,63	0,29	mmol/L	BMC
		59,3	44,5 - 74,1	4,9	U/L	
LDH	DGGR	0,984	0,738 - 1,230	0,082	μkat/L	BMC
		91,9	68,9 - 114,9	7,7	U/L	
	1,53	1,15 - 1,91	0,13	μkat/L	BMC	
LDH	Pyruvate	467	383 - 551	28	U/L	BMC
		7,76	6,36 - 9,16	0,47	μkat/L	
MAGNESIUM	Xylydyl Blue	219	180 - 258	13	U/L	C-RSE/IFCC ERM-AD453/IFCC (IRMM)
		3,64	2,98 - 4,30	0,22	μkat/L	
PHOSPHORUS	Phosphomolybdate/UV	1,54	1,23 - 1,85	0,10	mg/dL	SRM 956 (NIST)
		0,631	0,505 - 0,757	0,042	mmol/L	
POTASSIUM	Selective electrode	3,87	3,17 - 4,57	0,23	mg/dL	BMC
		1,25	1,03 - 1,48	0,08	mmol/L	
PROTEIN, TOTAL	Biuret	3,01	2,71 - 3,31	0,10	mmol/L	SRM 956 (NIST)
		59,7	52,5 - 66,9	2,4	g/L	
SODIUM	Selective electrode	113	102 - 124	4	mmol/L	SRM 956 (NIST)
		15,3	12,5 - 18,1	0,9	μmol/L	
TOTAL BILE ACIDS	Cyclic enzymatic	15,3	12,5 - 18,1	0,9	μmol/L	BMC
TRIGLYCERIDES	Glycerol phosphate oxydase/peroxydase	57,4	48,8 - 66,0	2,9	mg/dL	SRM 909 (NIST)
		0,649	0,552 - 0,746	0,032	mmol/L	
UIBC	Ferrozine	197	158 - 236	13	μg/dL	BMC
		35,3	28,2 - 42,4	2,4	μmol/L	
UREA/BUN	Urease (Color / UV)	58,5	46,8 - 70,2	3,9	mg/dL	SRM 909 (NIST)
		9,71	7,77 - 11,65	0,65	mmol/L	
URIC ACID	Uricase/peroxidase	5,54	4,71 - 6,37	0,28	mg/dL	SRM 909 (NIST)
		330	281 - 380	17	μmol/L	
ZINC	Br-PAPS	156	125 - 187	10	μg/dL	ERM DA-120
		23,9	19,1 - 28,7	1,6	μmol/L	

NOTES

The enzymes values (U/L and μkat/L) are for a incubation temperature of 37 °C.

BMC: BioSystems master calibrator.

C-RSE/IFCC: Traceable to the reference system as described by the IFCC Committee on Reference Systems for Enzymes.

(*) Use the BIOCHEMISTRY CALIBRATOR (Human) and BIOCHEMISTRY CONTROL SERUM (Human) I, II

(**) Use the BIOCHEMISTRY CONTROL SERUM I

Anexa 3.5. Limite componenți Ser de Control Biochimic Nivel II (patologic)



SUERO CONTROL DE BIOQUÍMICA
(HUMAN)

NIVEL:

LOTE:

COMPONENTE	MÉTODO	VALOR	LIMITES	1S	UNIDAD	TRAZABILIDAD
ACE	FAPGG	35,1	21,5 - 44,7	3,9	U/L	
ACE		0,549	0,357 - 0,741	0,064	μkat/L	BMC
ACID PHOSPHATASE FOSFATASA ÁCIDA	Naftil fosfato/pentanodiol	18,0	9,0 - 27,0	3,0	U/L	BMC
		0,298	0,149 - 0,447	0,050	μkat/L	
ALBUMINA	Verde de bromocresol	58,4	47,9 - 68,9	3,5	g/L	ERM-DA470/IFCC (IRMM)
ALKALINE PHOSPHATASE FOSFATASA ALCALINA	Tampón 2-amino-2-metil-1-propanol	221	181 - 261	13	U/L	C-RSE/IFCC
		3,66	3,00 - 4,32	0,22	μkat/L	BMC
	Tampón dietanolamina	311	255 - 367	19	U/L	
		5,16	4,23 - 6,09	0,31	μkat/L	BMC
ALT/GPT	IFCC sin Fosfato de piridoxal	137	112 - 162	8	U/L	
ALT/GPT		2,27	1,86 - 2,68	0,14	μkat/L	BMC
	IFCC con Fosfato de piridoxal	139	114 - 164	8	U/L	C-RSE/IFCC
		2,30	1,89 - 2,71	0,14	μkat/L	ERM-AD454/IFCC (IRMM)
α-AMYLASE AMILASA	IFCC	212	174 - 250	13	U/L	C-RSE/IFCC
		3,52	2,89 - 4,15	0,21	μkat/L	IRMM/IFCC-456 (IRMM)
	Sustrato directo	220	180 - 260	13	U/L	
		3,64	2,98 - 4,30	0,22	μkat/L	BMC
α-AMYLASE PANCREÁTIC α-AMILASA PANCREÁTICA	Inmunoinhibición	158	130 - 186	9	U/L	C-RSE/IFCC
		2,62	2,15 - 3,09	0,16	μkat/L	BMC
AST/GOT	IFCC sin Fosfato de piridoxal	152	125 - 179	9	U/L	
AST/GOT		2,52	2,07 - 2,97	0,15	μkat/L	BMC
	IFCC con Fosfato de piridoxal	156	128 - 184	9	U/L	C-RSE/IFCC
		2,60	2,13 - 3,07	0,16	μkat/L	ERM-AD457/IFCC (IRMM)
BILIRUBIN, DIRECT BILIRRUBINA (DIRECTA)	Sulfanilico diazoado	1,49	1,04 - 1,94	0,15	mg/dL	
		25,5	17,9 - 33,2	2,6	μmol/L	BMC
	Diclorofenildiazonio A25/A15	1,75	1,23 - 2,28	0,18	mg/dL	
		30,0	21,0 - 39,0	3,0	μmol/L	BMC
	Diclorofenildiazonio BA400/BA200	1,75	1,23 - 2,28	0,18	mg/dL	
		30,0	21,0 - 39,0	3,0	μmol/L	BMC
BILIRUBIN, TOTAL BILIRRUBINA TOTAL	Sulfanilico diazoado / Diclorofenildiazonio	4,45	3,65 - 5,25	0,27	mg/dL	
		76,1	62,4 - 89,8	4,6	μmol/L	SRM 916 (NIST)
CALCIUM CALCIO	Azul de metilimol / α-cresoltaleina	13,8	12,1 - 15,5	0,6	mg/dL	SRM 956 (NIST)
		3,45	3,04 - 3,86	0,14	mmol/L	
	Arsenazo III	13,8	12,1 - 15,5	0,6	mg/dL	SRM 956 (NIST)
		3,45	3,04 - 3,86	0,14	mmol/L	
CHLORIDE CLORURO	Electrodo selectivo	127	114 - 140	4	mmol/L	SRM 956 (NIST)
CHOLESTEROL	Colesterol oxidasa/peroxidasa	231	195 - 266	12	mg/dL	
CHOLESTEROL		5,98	5,08 - 6,88	0,30	mmol/L	SRM 909 (NIST)
CHOLESTEROL HDL	Directo detergente	87,6	65,7 - 109,5	7,3	mg/dL	CDC Reference Method
CHOLESTEROL HDL		2,27	1,70 - 2,84	0,19	mmol/L	BMC
CHOLESTEROL HDL	Fosfolungstato/Mg - Colesterol oxidasa/peroxidasa	**	** - **	**	mg/dL	
CHOLESTEROL HDL		**	** - **	**	mmol/L	SRM 909 (NIST)
CHOLESTEROL LDL	Directo detergente	114	86 - 143	10	mg/dL	CDC Reference Method
CHOLESTEROL LDL		2,96	2,22 - 3,70	0,25	mmol/L	BMC
CHOLINESTERASE COLINESTERASA	Butirilcololina	8616	6462 - 10770	718	U/L	
		143	107 - 179	12	μkat/L	BMC
CK	IFCC	305	244 - 366	20	U/L	C-RSE/IFCC
CK		5,06	4,05 - 6,07	0,34	μkat/L	ERM-AD455/IFCC (IRMM)
COPPER-PAESA COBRE-PAESA	3,5-DiBr-PAESA	164	123 - 205	14	μg/dL	
		25,8	19,4 - 32,3	2,2	μmol/L	BMC
CREATININE CREATININA	Enzimático	3,61	2,96 - 4,26	0,22	mg/dL	
		319	262 - 376	19	μmol/L	SRM 967 (NIST)
	Jaffé compensado	3,40	2,79 - 4,01	0,20	mg/dL	
		301	247 - 355	18	μmol/L	SRM 967 (NIST)
	Jaffé no compensado	3,17	2,60 - 3,74	0,19	mg/dL	
		281	230 - 332	17	μmol/L	SRM 909 (NIST)


**SUERO CONTROL DE BIOQUÍMICA
(HUMAN)**
NIVEL: **II**LOTE: **032**

COMPONENTE	MÉTODO	VALOR	LIMITES	1S	UNIDAD	TRAZABILIDAD
GLUCOSE	Glucosa oxidasa/peroxidasa	211	179 - 243	11	mg/dL	SRM 965 (NIST)
GLUCOSA	Hexokinasa	11,7	9,9 - 13,5	0,6	mmol/L	
g-GT	IFCC	141	116 - 166	8	U/L	C-RSE/IFCC ERM-AD452/IFCC (IRMM)
GT		2,34	1,92 - 2,76	0,14	μkat/L	
beta-HYDROXYBUTYRATE	Hidroxibutirato deshidrogenasa/diaforasa	15,1	12,4 - 17,8	0,9	mg/dL	BMC
beta-HIDROXIBUTIRATO		1,46	1,20 - 1,72	0,09	mmol/L	
IRON	Ferrozina	198	163 - 233	12	μg/dL	BMC
HIERRO		35,5	29,3 - 41,7	2,1	μmol/L	
	Cromazurol B	217	179 - 256	13	μg/dL	BMC
		38,8	32,0 - 45,6	2,3	μmol/L	
LACTATE	LODI/POD	46,6	38,2 - 55,0	2,8	mg/dL	BMC
LACTATO		5,11	4,25 - 6,11	0,31	mmol/L	
LIPASE	Color	143	109 - 181	12	U/L	BMC
LIPASA		2,41	1,81 - 3,01	0,20	μkat/L	
	DGGR	•	• - •	•	U/L	BMC
		•	• - •	•	μkat/L	
LDH	Piruvato	924	758 - 1090	55	U/L	BMC
LDL/DH		15,3	12,5 - 18,1	0,9	μkat/L	
	IFCC	437	358 - 516	26	U/L	C-RSE/IFCC ERM-AD453/IFCC (IRMM)
		7,25	5,95 - 8,57	0,44	μkat/L	
MAGNESIUM	Azul de Xilidilo	2,90	2,32 - 3,48	0,19	mg/dL	SRM 956 (NIST)
MAGNESIO		1,19	0,95 - 1,43	0,08	mmol/L	
PHOSPHORUS	Fosfomolibdato/UV	9,89	8,09 - 11,63	0,59	mg/dL	BMC
FÓSFORO		3,18	2,61 - 3,75	0,19	mmol/L	
POTASSIUM	Electrodo selectivo	6,36	5,72 - 7,00	0,21	mmol/L	SRM 956 (NIST)
POTASIO						
PROTEIN, TOTAL	Biuret	90,0	79,2 - 100,8	3,6	g/L	SRM 927 (NIST)
PROTEÍNA (TOTAL)						
SODIUM	Electrodo selectivo	157	141 - 173	5	mmol/L	SRM 956 (NIST)
SODIO						
TOTAL BILE ACIDS	Cíclico enzimático	***	*** - ***	***	μmol/L	BMC
ÁCIDOS BILIARES TOTALES						
TRIGLYCERIDES	Glicerol fosfato oxidasa/peroxidasa	125	106 - 144	6	mg/dL	SRM 909 (NIST)
TRIGLICERIDOS		1,42	1,21 - 1,63	0,07	mmol/L	
UIBC	Ferrozina	275	220 - 330	18	μg/dL	BMC
UIBC		49,1	39,3 - 58,9	3,3	μmol/L	
UREA/BUN	Ureasa (Color/UV)	141	120 - 162	7	mg/dL	SRM 909 (NIST)
UREA		23,4	19,9 - 26,9	1,2	mmol/L	
URIC ACID	Uricasa/peroxidasa	10,9	9,3 - 12,5	0,5	mg/dL	SRM 909 (NIST)
ÁCIDO ÚRICO		651	553 - 749	33	μmol/L	
ZINC	Br-PAPS	751	601 - 901	50	μg/dL	ERM DA-120
ZINC		115	92 - 138	8	μmol/L	

NOTAS

Los valores enzimáticos (U/L y μkat/L) son para una temperatura de incubación de 37 °C.

BMC: Calibrador maestro de BioSystems.

C-RSE/IFCC: Trazable al sistema de referencia descrito por el Comité IFCC de Sistemas de Referencia para Enzimas.

(*) Utilizar el CALIBRADOR BIOQUÍMICA (Humano) y el SUERO CONTROL DE BIOQUÍMICA (Humano) I, II

(**) Utilizar el SUERO CONTROL DE BIOQUÍMICA I

(***) Utilizar el CALIBRADOR BIOQUÍMICA y el SUERO CONTROL DE BIOQUÍMICA I, II

Anexa 15.1. Factorul ISI și construcția curbei de calibrare pentru determinarea Timpului de Protrombină (PT)



PROTHROMBIN TIME (PT)

 LOT 041

UNITS	UNITS	UNITS
%	s	s
100	12,1	12,1
50	16,9	16,9
33	21,9	21,9
25	26,6	26,6
ISI	1,25	1,25
Instrument type:	Optical I: BioSystems COAX	Optical I: BIOMERIEUX OPTION 4 PLUS, DIAGON COAG-4D, DIA-TIMER, RAYTO: RT-2202, RT-2204, RAC-050, other

NOTE 1: This calibration curve must be used only with this lot

NOTE 2: The Mean Normal PT (MNPT) corresponds to 100% of the calibration curve is given for orientation only.
Each laboratory should establish its own local value.

Bibliografie

Aguilar-Lira GY, Álvarez-Romero GA, Zamora-Suárez A, Palomar-Pardavé M, Rojas-Hernández A, Rodríguez-Ávila JA, Páez-Hernández ME (2017). New insights on diclofenac electrochemistry using graphite as working electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 794, 182–188. <https://doi.org/10.1016/j.jelechem.2017.03.050>.

Albu RA (2001). *Caiet de laborator de biochimie*. https://www.academia.edu/21273500/Caiet_de_laborator.

Alula MT, Karamchand L, Hendricks NR, Blackburn JM (2018). Citrate-capped silver nanoparticles as a probe for sensitive and selective colorimetric and spectrophotometric sensing of creatinine in human urine. *Analytica Chimica Acta*, 1007, 40-49. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.12.016>.

Ausubel, M. F., Brent, R., Kingston, E. R., Moore, D. D., Seidman, J.G., Smith, A. J., Struhl, K. (2002) –Short Protocols in Molecular Biology, 5th Ed., p 10.1-10.31. John Wiley & Sons. ISBN 978-0471250920.

Banciu D, Oarda M (1964). *Intoxicatii acute*. Editura Medicala Bucuresti.

Barba C, Méndez S, Martí M, Parra JL, Coderch L (2009). Water content of hair and nails. *Thermochimica Acta*, 494, 136–140. <https://doi.org/10.1016/j.tca.2009.05.005>.

Berghof V 6.0 - Application Report Microwave Pressure Digestion Food, Pharma, Cosmetics.

Betteridge DJ (1989). High Density Lipoprotein and Coronary Heart Disease. In *BMJ* 298(6679), 974-5. 1989. <https://doi.org/10.1136/bmj.298.6679.974>.

Bioclinica – Glucoza in LCR. <https://bioclinica.ro/analize/biochimie/glucoza-in-lichid-cefalorahidian>.

BioSystem Cholesterol 2022. Determinare Cholesterol, Ref. 11539.

BioSystem Acid uric2022. Determinare Acid uric – Uricază/Peroxidază.

Briciu AC (2010). Variabilitatea serologică și moleculară a unor izolate ale virusului plum pox din Bazinul Central Pomicol al Transilvaniei, Rezumat teza de doctorat, USAMV Cluj Napoca.

Brodkorb A, Ballance S, Bohn T, Bourlieu-Lacanal C, Boutrou R, Carrière F, Clemente A, Corredig M, Dupont D, Dufour C, Edwards C, Golding M, Karakaya S, Kirkhus B, Le Feunteun S, Lesmes U, Macierzanka A, Mackie AR, Martins C, Marze S, McClements DJ, Ménard O, Minekus M, Portmann R, Santos CN, Souchon I, Singh RP, Vegarud GE, Wickham MSJ, Weitschies W, Recio I (2019). INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. *NATURE*

PROTOCOLS. <https://doi.org/10.1038/s41596-018-0119-1>.

Burstein M, Scholnick HR, Morfin R (1970). Rapid method for isolation of lipoproteins from human serum by precipitation with polyanion. *Journal of Lipid Research*, 11, 583. [https://doi.org/10.1016/S0022-2275\(20\)42943-8](https://doi.org/10.1016/S0022-2275(20)42943-8).

Brunzel NA (2004). *Fundamentals of urine and body fluid analysis*. 2nd Ed. Philadelphia: Saunders. ISBN 978-0323711975.

Cleeman JI (2001). Executive summary of the third report of the national cholesterol education program (NCEP) expert panel on detection, evaluation and treatment of high blood cholesterol in adults. *JAMA* 285, 2486-97. <https://doi.org/10.1001/jama.285.19.2486>.

Cotroiu M, Proca M. (1988). *Toxicologie analitica*. Editura Medicala.

COATRON M1 0 Operation Manual – TECO, GmbH, Germany, Id. No 3842801-Rev. 8.

Csid.ro (a) – ce se întâmplă doctore ? <https://www.csid.ro/health/sanatate/7-lucruri-pe-care-saliva-le-poate-dezvalui-despre-sanatatea-ta-16227250>.

Csid.ro (b) – ce se întâmplă doctore ? <https://www.csid.ro/analize-medicale/vitamina-c-11275584>.

Donna Medical Center - <https://www.donna-medicalcenter.ro/servicii-medicale/analize-medicale/testul-de-toleranta-la-glucoza-oral-a-ogtt.html>.

Dronca M, Drugan C, Crăciun A, Nistor T, Dican L, Silaghi C, Rusu R. (2014). *Biochimie Medicală – Caiet de lucrări practice*, Editura Mega, Cluj Napoca.

Egawa M, Fukuhara T, Takahashi M, Ozaki Y. (2003). Determining water content in human nails with a portable near-infrared spectrometer. *Applied Spectroscopy*, 57, 473–480. <https://doi.org/10.1366/00037020360626032>.

Farhan KM, Sastry TP, Mandal AB (2011). Comparative study on secondary structural changes in diabetic and non-diabetic human finger nail specimen by using FTIR spectra, *Clinica Chimica Acta*, 412, 386–389. <https://doi.org/10.1366/00037020360626032>.

Fernandez FI, Kahn HL (1971). Analytical methods for atomic absorption spectroscopy. *Clinical Chemistry Newsletters*, 3, 24.

Fischbach FT(a), Fischbach M, Stout K (2009). Chemistry studies. In *A Manual of Laboratory and Diagnostic Tests*. Lippincott Williams & Wilkins, USA, 8 Ed., 369-370. ISBN/ISSN: 9781975173425.

Fischbach F, Fischbach M, Stout K (b) (2009). Effects of the Drugs on Laboratory Tests. In *A Manual of Laboratory and Diagnostic Tests*. Lippincott Williams & Wilkins, USA, 8 Ed., 2009; 1230-1231. ISBN/ISSN: 9781975173425.

Fischbach F, Fischbach M, Stout K (c). Effects of the Most Commonly Used Drugs on Frequently Ordered Laboratory Tests. In *A Manual of Laboratory and Diagnostic Tests*. Lippincott Williams & Wilkins, USA, 8 Ed. 2009, 1239-1240. ISBN/ISSN: 9781975173425.

Fischbach F, Fischbach M, Stout K (d). Urine Studies. In *A Manual of Laboratory and Diagnostic Tests*. Lippincott, Williams & Wilkins, USA, 8 Ed., 2009, 199-210. ISBN/ISSN: 9781975173425.

Fischbach F, Fischbach M, Stout K (e). Drug Monitoring. în *A Manual of Laboratory and Diagnostic Tests*. Lippincott Williams & Wilkins, USA, 7 Ed., 2004, 415-420. ISBN/ISSN: 9781975173425.

Georgescu S, Costache M (2009). *Lucrări practice biochimia acizilor nucleici și biologie moleculară*. Editura Univ. din București. ISBN: 978-973-737-770-8.

Ghid de practică pentru medicii de familie (2005). *Diabetul zaharat tip 2*. Editura Infomedica. ISBN/Cod: 973-7912-47-0.

Jacques Wallach (a) (2001). Boli metabolice si ereditare. In *Interpretarea testelor de diagnostic*. Editura Stiintelor Medicale, Romania, 7 Ed., 121-150, 653-752.

Jacques Wallach (b) (2001). Analizele de sange. In *Interpretarea testelor de diagnostic*. Editura Stiintelor Medicale, Romania, 7 Ed., 653-752.

Jacques Wallach (c) (2001). Urina. In *Interpretarea testelor de diagnostic*. Editura Stiintelor Medicale, Romania, 7 Ed., 121-150.

Jacques Wallach (d) (2001). Afectiuni hepatobiliare si pancreatice. In *Interpretarea testelor de diagnostic*. Editura Stiintelor Medicale, Romania, 7 Ed., 346-348.

Laboratory Corporation of America (a) (2010). *Directory of Services and Interpretive Guide*. Glucose, Serum. www.labcorp.com. Ref Type: Internet Communication.

Laboratory Corporation of America (b) (2010). *Directory of Services and Interpretive Guide*. Urea Nitrogen, Serum. www.labcorp.com. Ref Type: Internet Communication.

Laboratory Corporation of America (c) (2010). *Directory of Services and Interpretive Guide*. Uric Acid, Serum. www.labcorp.com. Ref Type: Internet Communication.

Laboratory Corporation of America (d) (2010). *Directory of Services and Interpretive Guide*. Creatinine, Serum. www.labcorp.com. Ref Type: Internet Communication.

Laboratory Corporation of America (e) (2010). *Directory of Services and Interpretive Guide*. Creatinine, 24-Hour, Urine. www.labcorp.com. Ref Type: Internet Communication.

Laborator MedCenter (a). Lactat în LCR. <https://medcenter.ro/dictionar-de-analize/lactat-in-lcr>.

Laborator MedCenter (b). Acid lactic în sânge. <https://medcenter.ro/dictionar-de-analize/lactat-in-sange>.

Laborator MedLife (c). Sumar de urină. <https://www.medlife.ro/sumar-de-urina>.

Laborator MedLife (d). Acid uric. <https://www.medlife.ro/acid-uric>.

Laborator Regina Maria (a). <https://www.reginamaria.ro/articole-medicale/ce-semnifica-culoarea-urinei-infografic>.

Laborator Regina Maria (b). <https://www.reginamaria.ro/dictionar/calcul-renalbiliarglanda-salivara-analiza-fizica-si-chimica>.

Laborator Synevo (a) (2010). Colesterol total. Referintele specifice tehnologiei de lucru utilizate. Ref Type: Catalog. <https://www.synevo.ro/colesterol-total/>.

Laborator Synevo (b). Alcoolemie. <https://www.synevo.ro/alcoolemie/>.

Laborator Synevo (c) (2010). Colesterol HDL. Referintele specifice tehnologiei de lucru utilizate. Ref Type: Catalog. <https://www.synevo.ro/hdl-colesterol/>.

Laborator Synevo (d) (2010). Glucoză serică. Referintele specifice tehnologiei de lucru utilizate. Ref Type: Catalog. <https://www.synevo.ro/glucoza-serica/>.

Laborator Synevo (e). Alaninaminotransferază (GPT/ALAT/ALT). <https://www.synevo.ro/alaninaminotransferaza-gptalatalt/>.

<https://www.aatbio.com/resources/buffer-preparations-and-recipes/phosphate-buffer-ph-5-8-to-7-4>.

Laborator Synevo (f) (2010). Fosfataza alcalina. Referintele specifice tehnologiei de lucru utilizate. Ref Type: Catalog. <https://www.synevo.ro/fofosfataza-alcalina/>.

Laborator Synevo (g) (2015). Uree serică, Referinte specifice tehnologiei de lucru utilizate. Ref Type: Catalog., <https://www.synevo.ro/uree-serica/>.

Laborator Synevo (h) (2015). Acid uric seric, Referinte specifice tehnologiei de lucru utilizate. Ref Type: Catalog. <https://www.synevo.ro/acid-uric-seric/>.

Laborator Synevo (i) (2015). Fosfor seric, Referinte specifice tehnologiei de lucru utilizate. Ref Type: Catalog <https://www.synevo.ro/fofosfor-seric/>.

Laborato Synevo (j) (2015). Creatinină serică. Referintele specifice tehnologiei de lucru utilizate. Ref Type: Catalog. <https://www.synevo.ro/creatinina-serica/>.

Laborator Synevo (k) (2010). Bilirubină serică. Referinte specifice tehnologiei de lucru utilizate. Ref Type: Catalog. <https://www.synevo.ro/bilirubina-totala-directa-si-indirecta/>.

Laborator Synevo (l) (2010). Urină-Biochimie. Referinte specifice tehnologiei de lucru utilizate. Ref Type: Catalog. <https://www.synevo.ro/urina-biochimie/>.

Laborator Synevo (m) (2010). Acid uric urinar, Referinte specifice tehnologiei de lucru utilizate. Ref Type: Catalog. <https://www.synevo.ro/acid-uric-urinar/>.

Laborator Synevo (n)(2010). Clor urinar, Referinte specifice tehnologiei de lucru utilizate. Ref Type: Catalog. <https://www.synevo.ro/acid-uric-urinar/>.

Laborator Synevo (o) (2010). Creatinină urinară. Referinte specifice tehnologiei de lucru utilizate. Ref Type: Catalog. <https://www.synevo.ro/creatinina-urinară>.

Laborator Synevo (p) (2010). Vitamina- c. Referinte specifice tehnologiei de lucru utilizate. Ref Type: Catalog. <https://www.synevo.ro/vitamina-c/>.

Laborator Synevo (r) (2010). Amilază serică. Referințe specifice tehnologiei de lucru utilizate. Ref Type: Catalog. <https://www.synevo.ro/amilaza-serica-izoenzime/>.

Laborator Synevovet. Acid lactic. <http://synevovet.ro/index-analize/categorii/biochimie/56-acid-lactic-cch16>.

Lipid Laboratory Johns Hopkins University School of Medicine (2007). Laboratory procedure manual - HDL- Cholesterol. https://www.cdc.gov/nchs/data/nhanes/nhanes_05_06/hdl_d_met_cholesterol_hdl_h717.pdf.

Lopez – Virella MF, Stone P, Ellis S, Colwell JA (1977). Cholesterol determination in high-density lipoproteins separated by three different methods. *Clinical Chemistry*, 23, 882-884. PMID: 192488.

Lothar T. (a) (1998). Blood glucose. In *Clinical Laboratory Diagnostics-Use and Assessment of Clinical Laboratory Results*. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt /Main, Germany, 1 Ed., 131-139. ISBN 3-9805215-4-0.

Lothar T. (b) (1998). Kidney and urinary tract. In *Clinical Laboratory Diagnostics-Use and Assessment of Clinical laboratory Results*. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt /Main, Germany, 1 Ed., 374-377. ISBN 3-9805215-4-0.

Lothar T. (c) (1998). Uric acid. In *Clinical Laboratory Diagnostics-Use and Assessment of Clinical Laboratory Results*. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt /Main, Germany, 1 ed. 1998, 208-214. ISBN 3-9805215-4-0.

Lothar T. (1998). Kidney and urinary tract. In *Clinical Laboratory Diagnostics Use and Assessment of Clinical Laboratory Results*. TH-Books Verlagsgesellschaft mbH, Frankfurt /Main, Germany, 1 ed., 208-214.. 1998; 362-364. ISBN 3-9805215-4-0.

Manualul de utilizare Analizor Automat de Hematologie – RT-6700, Biosystems

Marshall RC, Orwin DF, Gillespie JM. (1991). Structure and biochemistry of mammalian hard keratin. *Electron Microscopy Review*, 4, 47–83. doi: 10.1016/0892-0354(91)90016-6.

Mayo Clinic. Mayo Medical Laboratories. Test Catalog: Ascorbic Acid, Plasma. www.mayomedicallaboratories.com. Ref Type: Internet Communication.

McBride LJ (1998). Textbook of Urinalysis and Body Fluids: A Clinical Approach. Philadelphia: Lippincott. ISBN 978-0397552313.

MacFadyen DA (1945). Estimation of formaldehyde in biological mixtures. *Journal of Biological Chemistry*, 158(1), 107-133. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(17\)41599-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(17)41599-7).

McPherson RA, Pincus MR (2016). Henry's clinical diagnosis and management by laboratory methods, 23rd Edition, Ed. Elsevier, 1584 pag.

Med Center – Glucoză în LCR (glicorahie). <https://medcenter.ro/dictionar-de-analize/glucoza-in-lcr-glicorahie>.

Mihaly Cozmuța A., Mihaly Cozmuța L. (2019). Îndrumător de chimie analitică și analiză instrumentală, Editura UTCN.

Mishkind DI (1952). An aid in the Nicloux method for determining blood alcohol. *Med Techn Bull.* 3(2), 70. PMID: 14909971.

Mundy GR, Guise TA (1999). Hormonal control of calcium homeostasis, *Clinical Chemistry*, 45, 1347–1352. <https://doi.org/10.1093/clinchem/45.8.1347>.

Mundt L (2016). Graff's Textbook of Urinalysis and Body Fluids. Third Edition. ISBN: 9781284221411.

MWS-2. Application Report, Microwave Pressure Digestion, Food, Pharma, Cosmetics, 18.

Navazesh M, Christensen C, Brightman V (1992). Clinical criteria for the diagnosis of salivary gland hypofunction. *Journal of Dentall Research*, 71, 1363–1369. <https://doi.org/10.1177/0022034592071007030>.

Neuendorf J (2020). Urine sediment. Springer Ed. ISBN 9783030159108.

Nowak B, Chmielnicka J (2000). Relationship of lead and cadmium to essential elements in hair, teeth and nails of environmentally exposed people. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46, 265-274. . <https://doi.org/10.1006/eesa.2000.1921>.

Ohno T, Sakamoto M, Kurosawa T, Dakeishi M, Iwata T, Murata K (2007). Total mercury levels in hair, toenail, and urine among women free from occupational exposure and their relations to renal tubular function. *Environmental Research*, 103, 191–197. . <https://doi.org/10.1016/j.envres.2006.06.009>.

PCFarm.ro – Hemoglobina, https://www.pcfarm.ro/analize_medicale/256/Hemoglobina

Pintea A, Andrei S, Bele C (2008). Biochimie medicala veterinara – Lucrari practice, Editura AcademicPres, Cluj Napoca.

Popa CE (1998). Metabolismul lipidelor. In Biochimie Medicala. Veronica Dinu, Eugen Trutia, Elena Popa-Cristea, Aurora Popescu, Editura Medicala, Romania, 2 ed., 1998, 394-478.

Prospect – Alkaline phosphatase, Biosystems 2022.

Prospect – Creatinine, Biosystems, 2022.

Prospect Glucoză – Biosystems, 2022.

Prospect Urea/Bun color – Biosystems, 2022.

Prospect Acid uric/Uricază/Peroxidază – Biosystems, 2022.

Prospect Protein (Urine) – BioSystems, 2022.

Prospect Proteine serice totale – BioSystems, 2022.

Prospect Cholesterol HDL – Biosystems, 2022.

Prospect Immunoglobulin G – Biosystems, 2023.

Prospect Rheumatoid factors - Biosystems, 2022.

Prospect C-Reactive protein, Biosystems, 2022.

Prospect – Triglycerides, Biosystems, 2022.

Prospect – Total Bile acids, Biosystems, 2022.

Prospect – Total iron binding capacity, Biosystems, 2022.

Raman G, Selvaraju R (2008). FTIR spectroscopic analysis of human gallstones, Romanian Journal of Biophysic, 18(4), 309–316.

Reiner M, Fenichel R (1948). Dialysis of protein solution for electrophoresis, Science, 108, 1948. <https://doi.org/10.1126/science.108.2798.164>.

Ridley JW (2018). Fundamentals of the study of urine and body fluids. Springer International Publishin, ISBN 978-3-319-78416-8

Roman L, Morait Gh (1983). Chimie analitica, Editura Didactica si Pedagogica, București.

Ross DL, Neeley AE (1983). Textbook of urinalysis and body fluids. New York:Appleton-Century-Crofts. ISBN 978-0838589137.

Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. (1989). Molecular cloning – A laboratory manual, 1847-1858. Cold Spring Harbour Laboratory Press. ISBN 978-1-936113-42-2.

Sapkota A (2022). Millon's test-Definition, principle, procedure, result, uses. Microbe notes. <https://microbenotes.com/millons-test/>.

Ship JA, Fox PC, Baum B (1991). How much saliva is enough? "Normal" function defined. The Journal of The American Dental Association, 122, 63–69. <https://doi.org/10.14219/jada.archive.1991.0098>.

Slotnick MJ, Nriagu JO (2006). Validity of human nails as a biomarker of arsenic and

selenium exposure: A review, *Environmental Research*, 102, 125–139. <https://doi.org/10.1016/j.envres.2005.12.001>.

Sobotka H, Reiner M (1930). The Hagedorn-Jensen method applied to various sugars. *Biochemical Journal*, 24(2), 394–399. doi: 10.1042/bj0240394.

Spinelli D, Consonni D, Garigali G, Fogazzi GB (2013). Waxy casts in the urinary sediment of patients with different types of glomerular diseases: Results of a prospective study. *Clinica Chimica Acta*, 424(23), 47-52. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2013.05.009>.

Sun J, Zhang XJ, Broderick M, Fein H (2003). Measurement of nitric oxide production in biological systems by using Griess reaction assay. *Sensors*. 3, 276–284. <https://doi.org/10.3390/s30800276>.

Strasinger S, DiLorenzo MS (2008). *Urinalysis and body fluids*. 5th Ed. Philadelphia: FA Davis Company. ISBN 978-0-8036-1697-4.

Toth PP (2005). The “Good Cholesterol”, high-density lipoprotein. *Circulation*, 111, 89-91. <https://doi.org/10.1161/01.CIR.0000154555.07002.CA>.

Trudeau DL, Freier EF (1967). Determination of calcium in urine and serum by atomic absorption spectrophotometry (AAS). *Clinical Chemistry*, 13, 101. <https://doi.org/10.1093/clinchem/13.2.101>.

Viman V, Mihai M. (1994). *Chimie analitică calitativă – Îndrumător de lucrări de laborator*, Editura Universității de Nord.

Zhaoa J, Lub Y, Fanb C, Wang J, Yang Y (2015). Development of a cloud point extraction and spectrophotometry-based microplate method for the determination of nitrite in human urine and blood. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 136(B), 802-807. <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.09.097>.


Weisinger JR, Bellorin-Font E (1998). Magnesium and phosphorus, *Lancet*, 352, 391–396. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(97\)10535-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(97)10535-9).

Were FH, Njue W, Murungi J, Wanjau R (2008). Use of human nails as bio-indicators of heavy metals environmental exposure among school age children in Kenya. *Science of Total Environment*, 393, 376 – 384. <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2007.12.035>.

White R, Yaeger D, Stavrianeas S (2009). Determination of blood lactate concentration: Reliability and validity of a lactate oxidase-based method. *International Journal of Exercise Science* 2(2), 83-93. <https://doi.org/10.7208/chicago/9780226895154.003.0003>.

Willis JB (1961). Determination of calcium and magnesium in urine by atomic absorption spectroscopy. *Analytical Chemistry*, 33(4), 556-559. <https://doi.org/10.1021/ac60172a021>.

Autorii doresc să transmit un mesaj de mulțumire și apreciere

Companiei  **BioSystems** **pentru calitatea deosebită a echipamentelor, serviciilor și produselor oferite.**