



MD 963 Z 2016.05.31

REPUBLICA MOLDOVA



(19) Agenția de Stat
pentru Proprietatea Intelectuală

(11) **963** (13) **Z**
(51) Int.Cl: *G01N 33/52* (2006.01)
G01N 33/536 (2006.01)

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

(21) Nr. depozit: s 2015 0021 (22) Data depozit: 2015.03.19	(45) Data publicării hotărârii de acordare a brevetului: 2015.10.31, BOPI nr. 10/2015
(71) Solicitant: IMSP INSTITUTUL DE FTIZIOPNEUMOLOGIE "CHIRIL DRAGANIUC", MD (72) Inventatori: GHINDA Serghei, MD; ABABII Ion, MD; DANILOV Lucian, MD; CHIROȘCA Valentina, MD; LESNIC Evelina, MD; CARAIANI Olga, MD; GUILA Angela, MD (73) Titular: IMSP INSTITUTUL DE FTIZIOPNEUMOLOGIE "CHIRIL DRAGANIUC", MD	

**(54) Metodă de determinare a gradului de intoxicație endogenă la copii cu
amigdalită cronică****(57) Rezumat:**

1

Invenția se referă la medicină, și anume la imunologie și poate fi utilizată pentru determinarea gradului de intoxicație endogenă la copiii cu amigdalită cronică.

Conform invenției, metoda constă în aceea că se colectează sânge, se separă serul sangvin și se introduc câte 50 μ l de ser în trei eprubete, la care se adaugă câte 100 μ l de soluție tampon boric și soluție de polietilenglicol (PEG) de 2,5%, 4,2% și 8,0%, iar în a patra eprubetă de control se introduc 50 μ l de ser și 100 μ l de soluție tampon boric, apoi eprubetele se incubează pentru 15 min la temperatura camerei, după care se determină densitatea optică la lungimea de undă de 340 nm, iar concentrația complexelor imune circulante (CIC) în fiecare eprubetă se determină conform formulei:

$CIC = (DOEDS - DOEDC) \cdot 1000$,
unde:

DOEDS – densitatea optică în eprubeta de studiu, în UC;

2

DOEDC – densitatea optică în eprubeta de control, în UC,

în cazul în care în eprubeta cu concentrația PEG 2,5% CIC este mai mare de 10 UC, cu concentrația PEG 4,2% CIC este mai mare de 40 UC și cu concentrația PEG 8,0% CIC este mai mare de 240 UC se diagnostichează un grad înalt de intoxicație endogenă, în cazul în care în eprubeta cu concentrația PEG 2,5% CIC este mai mic de 10 UC, cu concentrația PEG 4,2% CIC este mai mic de 40 UC și cu concentrația PEG 8,0% CIC este mai mic de 240 UC – un grad mediu de intoxicație endogenă, iar în cazul în care în eprubeta cu concentrația PEG 2,5% CIC este mai mare de 10 UC, cu concentrația PEG 4,2%, CIC este mai mic de 40 UC și cu concentrația PEG 8,0% CIC este mai mic de 240 UC – un grad minim de intoxicație endogenă.

Revendicări: 1

MD 963 Z 2016.05.31

(54) Method for determining the degree of endogenous intoxication in children with chronic tonsillitis

(57) Abstract:

1

The invention relates to medicine, particularly to immunology and can be used to determine the degree of endogenous intoxication in children with chronic tonsillitis.

According to the invention, the method consists in that blood is taken, serum is separated and are introduced 50 µl of serum into three tubes, to which are added 100 µl of borate buffer and 2.5%, 4.2% and 8.0% polyethylene glycol (PEG) solution, and into the fourth control tube are introduced 50 µl of serum and 100 µl of borate buffer, then the tubes are incubated for 15 min at room temperature, after which is determined the optical density at the wavelength of 340 nm, and the concentration of circulating immune complexes (CIC) in each tube is determined according to the formula:

$$\text{CIC} = (\text{ODTT} - \text{ODCT}) \times 1000,$$

where:

ODTT – optical density of the test tube, in CU;

ODCT – optical density of the control tube, in CU,

if in the tube with the PEG concentration of 2.5% the content of CIC is more than 10 CU,

2

with the PEG concentration of 4.2% the content of CIC is more than 40 CU and with the PEG concentration of 8.0% the content of CIC is more than 240 CU is diagnosed a high degree of endogenous intoxication, if in the tube with the PEG concentration of 2.5% the content of CIC is less than 10 CU, with the PEG concentration of 4.2% the content of CIC is less than 40 CU, with the PEG concentration of 8.0% the content of CIC is less than 240 CU – an average degree of endogenous intoxication, and if in the tube with the PEG concentration of 2.5% the content of CIC is more than 10 CU, with the PEG concentration of 4.2% the content of CIC is less than 40 CU and with the PEG concentration of 8.0% the content of CIC is less than 240 CU – a minimum degree of endogenous intoxication.

Claims: 1

(54) Метод определения степени эндогенной интоксикации у детей с хроническим тонзилитом

(57) Реферат:

1

Изобретение относится к медицине, в частности к иммунологии и может быть использовано для определения степени эндогенной интоксикации у детей с хроническим тонзилитом.

Согласно изобретению, метод состоит в том, что забирают кровь, отделяют сыворотку и вводят по 50 µl сыворотки в три пробирки, в которые добавляют по 100 µl боратного буфера и раствор полиэтиленгликоля (ПЭГ) 2,5%, 4,2% и 8,0%, а в четвертую контрольную пробирку вводят 50 µl сыворотки и 100 µl боратного буфера, затем пробирки инкубируют 15 мин при комнатной температуре, после чего определяют оптическую плотность при длине волны 340 нм, а концентрацию циркулирующих иммунных комплексов (ЦИК) определяют согласно формуле:

$$\text{ЦИК} = (\text{ОПОП} - \text{ОПКП}) \times 1000,$$

где:

ОПОП - оптическая плотность опытной пробирки в УЕ;

2

ОПКП - оптическая плотность контрольной пробирки в УЕ, в случае если в пробирке с концентрацией ПЭГ 2,5% содержание ЦИК более 10 УЕ, с концентрацией ПЭГ 4,2% содержание ЦИК более 40 УЕ и с концентрацией ПЭГ 8,0% содержание ЦИК более 240 УЕ то диагностируют высокую степень эндогенной интоксикации, в случае если в пробирке с концентрацией ПЭГ 2,5% содержание ЦИК менее 10 УЕ, с концентрацией ПЭГ 4,2% содержание ЦИК менее 40 УЕ и с концентрацией ПЭГ 8,0% содержание ЦИК менее 240 УЕ – среднюю степень эндогенной интоксикации, и в случае если в пробирке с концентрацией ПЭГ 2,5% содержание ЦИК более 10 УЕ, с концентрацией ПЭГ 4,2% содержание ЦИК менее 40 УЕ и с концентрацией ПЭГ 8,0% содержание ЦИК менее 240 УЕ диагностируют минимальную степень эндогенной интоксикации.

П. формулы: 1

Descriere:

Invenția se referă la medicină, și anume la imunologie și poate fi utilizată pentru determinarea gradului de intoxicație endogenă la copiii cu amigdalită cronică.

5 Este cunoscută o metodă de determinare a complexelor imune circulante (CIC) prin precipitarea lor din serul sangvin. Metoda este bazată pe precipitarea selectivă a complexelor antigen-anticorpi cu polietilenglicol (PEG) 3,75% cu determinarea spectrofotometrică consecutivă a precipitatului. Pentru realizarea reacției sunt preparate soluția nr. 1 (0,1 M de tampon borat pH 8,4) și soluția nr. 2 (polietilenglicol în concentrație de 3,75% în soluția nr. 1).
 10 Intr-o eprubetă se introduc 0,3 ml ser sangvin, se adaugă 0,6 ml de soluție nr. 1 și se amestecă minuțios, după care se transferă câte 0,3 ml soluție în două eprubete. În una dintre acestea se adaugă 2,7 ml de soluție nr. 1 (soluția control), iar în cealaltă 2,7 ml soluție nr. 2 (soluția de cercetare). Conținutul eprubetelor se amestecă minuțios și se lasă pentru 60 min la temperatura camerei, după care se determină spectrofotometric densitatea optică a specimenelor la lungimea de undă de 450 nm, utilizând cuve cu dimensiunile de 1x1 cm. Se calculează diferența indicatorilor de densitate optică, rezultatul se multiplică cu 1000 și se obține cantitatea complexelor imune circulante în unități de densitate optică (UDO) [1].

Dezavantajul acestei metode constă în determinarea doar a CIC cu masă moleculară mică care sunt mai puțin toxice, ceea ce poate duce la interpretarea greșită a rezultatelor investigaționale și, drept urmare, la un diagnostic și un tratament incorecte, totodată pentru
 20 investigare este necesar un volum mare de ser, acesta fiind important în investigarea copiilor.

În calitate de cea mai apropiată soluție servește metoda de determinare a CIC de autorii Nemov V. și Popcova M. Esența acestei metode constă în faptul că suplimentar în serul sangvin în urma centrifugării scurte se diminuează turbiditatea. Pentru determinarea creșterii turbidității
 25 specifice în prezența PEG cu concentrația finală de 4% și pentru determinarea CIC mari și mici se utilizează spectrofotometrul cu microplășetă în regim bifazic (biundă) de bază 340 nm și filtrul de referință 620 nm. Pentru realizarea reacției se prepară:

- soluția 1 – soluție fiziologică tampon (pH 7,4); soluția 2 – soluție PEG de 8% (8,0 g PEG-6000 + 100,0 ml soluție 1); soluția 3 – soluție PEG de 12% (12,0 g PEG-6000 + 100,0 ml soluție 1);
 30

- în godeurile unei plăci standard (cu 96 godeuri) pentru investigații imunologice se pipetează câte 100 μl soluții de lucru: în toate godeurile stripului 1 – soluția 1; în toate godeurile stripului 2 – soluția 2; în toate godeurile stripului 3 – soluția 3; la necesitate se completează și celelalte stripuri, urmând aceeași consecutivitate a operațiunii de pipetare;
 35

- utilizând un dozator cu 8 canale, în fiecare strip (1, 2 și 3 corespunzător) se pipetează câte 100 μl din serurile sangvine diluate în prealabil. Pipetarea se repetă de 3-4 ori, respectând direcția: de la soluția 1 spre soluția 3 evitând formarea bulelor de aer. Imediat se fixează timpul de incubare, durata căruia trebuie să fie de 45 min, placa acoperindu-se și expunându-se pe durata acestui interval de timp la temperatura de 18...25°C;
 40

- se înregistrează datele cu ajutorul unui spectrofotometru (cu dispozitiv microplăci) măsurând densitatea optică în regimul a două lungimi de undă: de bază - 340 nm, filtru de referință - 620 nm.

În baza datelor obținute se calculează nivelul CIC cu masă moleculară mare și a celor cu masă moleculară mică conform formulei:
 45

Mari [CIC]=(DO medie Sol. 2 – DO medie Sol.1)?1000;

Mici [CIC]=(DO medie Sol. 3 - OΠ medie Sol. 1)?1000,

unde DO medie – valoarea aritmetică medie a densității optice a probei [2].

Dezavantajul acestei metode constă în determinarea doar a CIC mari și mici, pe lângă
 50 aceasta valorile absolute și medii ale datelor obținute sunt utilizate fără a ține cont de CIC cu greutate moleculară medie și nu se face o corelație dintre cantitatea CIC și gravitatea intoxicației endogene, la fel pentru interpretarea corectă a rezultatelor investigațiilor imune este necesar de apreciat normele fiziologice pentru CIC cu greutate moleculară mică, medie și mare. Totodată, printre dezavantajele metodei menționate este și faptul că se dublează investigația, ceea ce duce
 55 la majorarea cheltuielilor de material supus testării (serul sangvin), precum și de reactivi.

Problema pe care o rezolvă invenția propusă constă în determinarea CIC cu greutatea moleculară mare, medie și mică, pe baza cărora să se determine gravitatea intoxicației endogene la copiii cu amigdalită cronică printr-o metodă simplă și precisă în realizare.

Esența invenției constă în aceea că se colectează sânge, se separă serul sangvin și se introduc câte 50 μ l de ser în trei eprubete, la care se adaugă câte 100 μ l de soluție tampon boric și soluție de polietilenglicol (PEG) de 2,5%, 4,2% și 8,0%, iar în a patra eprubetă de control se introduc 50 μ l de ser și 100 μ l de soluție tampon boric, apoi eprubetele se incubează pentru 15 min la temperatura camerei, după care se determină densitatea optică la lungimea de undă de 340 nm, iar concentrația CIC în fiecare eprubetă se determină conform formulei:

$$CIC = (DOEDS - DOEDC) \cdot 1000,$$

unde:

DOEDS – densitatea optică în eprubeta de studiu, în UC;

DOEDC – densitatea optică în eprubeta de control, în UC,
 în cazul în care în eprubeta cu concentrația PEG 2,5% CIC este mai mare de 10 UC, cu concentrația PEG 4,2% CIC este mai mare de 40 UC și cu concentrația PEG 8,0% CIC este mai mare de 240 UC se diagnostichează un grad înalt de intoxicație endogenă, în cazul în care în eprubeta cu concentrația PEG 2,5% CIC este mai mic de 10 UC, cu concentrația PEG 4,2% CIC este mai mic de 40 UC și cu concentrația PEG 8,0% CIC este mai mic de 240 UC – un grad mediu de intoxicație endogenă, iar în cazul în care în eprubeta cu concentrația PEG 2,5% CIC este mai mare de 10 UC, cu concentrația PEG 4,2% CIC este mai mic de 40 UC și cu concentrația PEG 8,0% CIC este mai mic de 240 UC – un grad minim de intoxicație endogenă.

Rezultatul tehnic constă în determinarea complexelor imune circulante cu greutatea moleculară mare, medie și mică, pe baza cărora se determină gravitatea intoxicației endogene la copiii cu amigdalită cronică.

Metoda se realizează în felul următor.

Pregătirea soluției tampon boric 0,1M pH 8,4: pentru 250 ml se folosește acid boric 0,8525 g și Na tetraboric 1,07 g. Componentele se cântăresc, se adaugă în retorta chimică, se dizolvă în apă distilată, apoi se aduc la marcarea fixă.

Se prepară concentrațiile necesare ale PEG 2,5%, 4,2% și 8,0%. Deoarece soluția PEG pe tamponul borat nu este stabilă, acesta se pregătește *ex tempore*. Conform calculului, pentru o investigație cu concentrația 2,5% PEG se dizolvă 5 mg în 200 μ l tampon boric, pentru o investigație cu concentrația 4,5% PEG se dizolvă 8,33 mg în 200 μ l tampon boric, pentru o investigație cu concentrația 8% PEG se dizolvă 16 mg în 200 μ l tampon boric. Pentru determinarea finală a soluțiilor necesare se înmulțesc volumele estimate cu numărul de investigații.

Drept material pentru investigare servesc eșantioanele de ser sangvin uman obținute prin metode standard din sangele venos sau capilar. În acest scop din venă (sânge venos) sau deget (sânge capilar) se prelevă 0,3 ml sânge și se separă serul.

Eșantioanele de ser prelevate de la bolnavi se dizolvă în planșete cu fund rotund calculând 100 μ l tampon boric și 50 μ l ser investigat, obținându-se diluția de 3 ori a serului dizolvat.

În godeurile stripului 1 se plasează speciamele de control, în godeurile stripului 2 speciamele de studiu cu PEG-2,5%, în godeurile stripului 3 speciamele de studiu cu PEG-4,2%, în godeurile stripului 4 speciamele de studiu cu PEG-8,0%(vezi tab. 1).

Tabelul 1

Schema plasării ingredientelor necesare în planșete cu fund plat

	1 (control)	2 (PEG-2,5%)	3 (PEG-4,2%)	4 (PEG-8,0%)
Bolnav A	200 μ l TB 25 μ l SD3	200 μ l PEG 25 μ l SD3	200 μ l PEG 25 μ l SD3	200 μ l PEG 25 μ l SD3
Bolnav B	200 μ l TB 25 μ l SD3	200 μ l PEG 25 μ l SD3	200 μ l PEG 25 μ l SD3	200 μ l PEG 25 μ l SD3
Bolnav C	200 μ l TB 25 μ l SD3	200 μ l PEG 25 μ l SD3	200 μ l PEG 25 μ l SD3	200 μ l PEG 25 μ l SD3

Notă: TB - tampon boric; SD3 - serul în 3 diluții

Se incubează 15 min la temperatura camerei.

Citirea rezultatelor.

Pe reader se citesc indicatorii din fiecare godeu, notificandu-se în unități de densitate optică, și se determină concentrația CIC conform formulei:

$$\text{Concentrația CIC} = (\text{UDO (godeu de studiu)} - \text{UDO (godeu de control)}) \cdot 1000$$

Notă: UDO – unitate de densitate optică

Tabelul 2

Schema distribuției rezultatelor investigării concentrației CIC

	1 (Control)	2 (PEG-2,5%)	3 (PEG-4,2%)	4 (PEG-8,0%)
Rezultatul bolnavului A	0,060	0,070	0,100	0,300
Rezultatul bolnavului B	0,050	0,055	0,090	0,120
Rezultatul bolnavului C	0,040	0,090	0,140	0,560

5 Exemplu de calcul al concentrației CIC la bolnavul A:

CIC 2,5% = $(0,070 - 0,060) \times 1000 = 10$ UC;

CIC 4,2% = $(0,100 - 0,060) \times 1000 = 40$ UC;

CIC 8,0% = $(0,300 - 0,060) \times 1000 = 240$ UC.

Notă: UC – unități convenționale

10 Conform metodei revendicate mai sus, în vederea determinării gradului de intoxicație endogenă la copiii cu amigdalită cronică au fost investigate 198 de persoane de diferit gen și vârstă:

Copii 1...5 ani – 31;

Copii 6...10 ani – 37;

15 Copii 11...14 ani – 21;

Copii 15...18 ani – 19;

Adulți – 90.

La toate persoanele sănătoase s-a determinat concentrația CIC cu masă moleculară mică, medie și mare, de asemenea a fost realizată prelucrarea statistică a materialului obținut pentru

20 determinarea indicatorilor medii pentru fiecare fracție CIC (tab. 3).

Tabelul 3

Rezultatele prelucrării statistice a materialului obținut

Varsta	CIC cu PEG 2,5%				CIC cu PEG 4,2%				CIC cu PEG 8,0%				CTT
	M	δ	M+2 δ	CT1	M	δ	M+2 δ	CT2	M	δ	M+2 δ	CT3	
1...5	3,5	1,46	6,4	1,83	18,7	3,65	26,0	1,39	86	13,7	114	1,33	4,55
6...10	5,3	2,72	10,7	2,01	23,9	5,38	34,7	1,45	118	25,0	168	1,42	4,88
11...14	7,0	3,31	13,7	1,96	27,1	6,54	40,2	1,48	134	37,0	208	1,55	4,96
15...18	8,3	4,87	18,3	2,20	32,5	6,86	45,6	1,43	161	45,4	255	1,56	5,19
adulți	10,9	6,61	24,2	2,70	29,2	13,4	55,9	1,91	282	101,3	485	1,72	6,33

Notă: CT1 - coeficientul de toxicitate pentru CIC cu PEG 2,5%; CT2 - coeficientul de toxicitate pentru CIC cu PEG 4,2%, CT3 - coeficientul de toxicitate pentru CIC cu PEG 8,0%, CTT - coeficientul total al toxicității, M - media aritmetică a câtorva măsurări, δ - eroarea standard (eroarea pătratică medie) a unei singure măsurări, M+2 δ - intervalul care include 95,5% din totalitatea grupului de vârstă.

De asemenea, pentru fiecare grupă de vârstă s-a determinat coeficientul de toxicitate (CT), care reprezintă o valoare relativă, pentru fiecare fracție PEG, CT1 pentru 2,5%, CT2 pentru PEG 4,2% și CT3 pentru PEG 8,0%, dar și pentru fiecare grupă de vârstă conform formulei:

CT = $M+2\delta$ (grupului de vârstă) / M (grupului de vârstă), unde

M+2 δ – intervalul care include 95,5% din totalitatea grupului de vârstă;

35 M – media aritmetică a câtorva măsurări.

De asemenea, pentru fiecare grup de vârstă s-a determinat coeficientul total al toxicității (CTT), care reprezintă suma celor 3 coeficienți, obținuți la determinarea celor 3 fracții CIC (CT1+CT2+CT3), expus în tab. 3.

40 Avantajele invenției revendicate constau:

- în reducerea timpului de incubare la 15 min față de 45 min și a volumului de ser pentru testare la 25 μ l față de 100 μ l în soluția cea mai apropiată.

- la utilizarea metodei propuse, în cadrul căreia se utilizează trei concentrații ale PEG (2,5%, 4,2% și 8,0%), numărul total al indicatorilor cu valoare de diagnostic a crescut la 31,0% din copiii bolnavi de amigdalită cronică compensată, la 84,6% din copiii bolnavi de amigdalită

cronică decompensată și 100,0% din copiii cu patologii asociate (amigdalită cronică decompensată cu patologie reumatoidă), fapt ce demonstrează că utilizarea mai multor concentrații optimizate ale PEG permite identificarea unui număr mai mare de indicatori cu valoare de diagnostic în stadiul precoce al bolii și, respectiv, face posibilă inițierea oportună a unui tratament adecvat. Important este faptul că utilizând metoda propusă este posibilă identificarea bolnavilor cu intoxicație endogenă foarte înaltă: 13,8% din copiii bolnavi de amigdalită cronică compensată, 46,2% din copiii bolnavi de amigdalită cronică decompensată și 69,3% din copiii cu patologii asociate (amigdalită cronică decompensată cu patologie reumatoidă), ceea ce nu a fost posibil la aplicarea soluției apropiate (tab. 4);

10

Tabelul 4

Eficacitatea comparativă a diferitor metode de determinare a intoxicațiilor endogene la copiii cu

cu diferite forme ale amigdalitei cronice

	Forma amigdalitei	n	CIC pozitiv pentru MM mare (abs/%)	CIC pozitiv pentru MM medie (abs/%)	CIC pozitiv pentru MM mică (abs/%)	IE cu expresivitate foarte mare (abs/%)	Total
Soluția apropiată	ACC	29		3 / 10,3			3 / 10,3
	ACD	39		4 / 10,3			4 / 10,3
	ACD+PR	39		17 / 43,6			17 / 43,6
Cea mai apropiată soluție	ACC	29		3 / 10,3	4 / 13,8		5 / 17,2
	ACD	39		4 / 10,3	22 / 56,4		23 / 58,9
	ACD+PR	39		17 / 43,6	31 / 79,5		35 / 89,7
Metoda revendicată	ACC	29	3 / 10,3	3 / 10,3	7 / 24,1	4 / 13,8	9 / 31,0
	ACD	39	10 / 25,6	4 / 10,3	31 / 79,5	18 / 46,2	33 / 84,6
	ACD+PR	39	13 / 33,3	17 / 43,6	39 / 100,0	27 / 69,3	39 / 100,0

Notă: ACC - amigdalită cronică compensată; ACD - amigdalită cronică decompensată; ACD+PR - amigdalită cronică decompensată cu patologie reumatoidă, IE - intoxicație endogenă, MM – masa moleculară.

Analiza comparativă a eficacității diferitor metode de determinare a intoxicației endogene la copiii cu diferite forme de amigdalită cronică arată că aplicarea soluției apropiate [Гриневич Ю.А., Алферов А.Н. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных. // Лабораторное дело, 1981, №8, p. 493-496] a permis la utilizarea concentrației PEG 3,75% determinarea indicatorilor cu valoare de diagnostic la 10,3% din copiii bolnavi de amigdalită cronică compensată, la un număr identic de copii bolnavi de amigdalită cronică decompensată și la 43,6% din copiii cu patologii asociate (amigdalită cronică decompensată cu patologie reumatoidă).

La realizarea celei mai apropiate soluții [Немов В. В., Попкова М. И. Способ определения циркулирующих иммунных комплексов - RU 2415430], în cadrul căreia se utilizează două concentrații PEG (4,0% și 6,0%) numărul bolnavilor, având rezultatele indicatorilor cu valoare de diagnostic la PEG 4,0%, a fost identic cu cel de la folosirea metodei 1, deoarece concentrațiile PEG 4,0% și 3,75% sunt practic similare. Însă la utilizarea concentrației PEG 6,0%, a fost posibilă identificarea suplimentară a indicatorilor cu valoare de diagnostic la 13,8% din copiii bolnavi de amigdalită cronică compensată, la 56,4% din copiii bolnavi cu amigdalită cronică decompensată și la 79,5% din copiii cu patologii asociate (amigdalită cronică decompensată cu patologie reumatoidă). La calculul concomitent al celor două concentrații de PEG (4,0% și 6,0%), numărul total al indicatorilor cu valoare de diagnostic s-a majorat până la 17,2% din copiii bolnavi de amigdalită cronică compensată, până la 58,9% din copiii cu amigdalită cronică decompensată și până la 89,7% din copiii cu patologii asociate (amigdalită cronică decompensată cu patologie reumatoidă).

La aplicarea metodei revendicate, în cadrul căreia s-a utilizat PEG 4,2%, a fost identificat aproape același număr de indicatori cu valoare de diagnostic în toate grupurile de bolnavi

analizați comparativ cu concentrațiile PEG 3,75%, 4,0% și 4,2%. Însă, concentrația PEG 8,0% a permis identificarea unui număr mai mare de indicatori cu valoare de diagnostic, comparativ cu concentrația PEG de 6,0% (corespunzător grupurilor de bolnavi analizați 24,1%, 79,5%, 100,0% și 13,8%, 56,4%, 79,5%). Totodată, la aplicarea metodei propuse au fost identificați indicatori cu

5 amigdalită cronică compensată, la 25,6% din copiii bolnavi de amigdalită cronică decompensată și la 33,3% din copiii cu patologie asociată (amigdalită cronică decompensată cu patologie reumatoidă).

10 La aplicarea metodei revendicate, în cadrul căreia se utilizează trei concentrații ale PEG (2,5%, 4,2% și 8,0%), numărul total al indicatorilor cu valoare de diagnostic a crescut la 31,0% din copiii bolnavi de amigdalită cronică compensată, la 84,6% din copiii bolnavi de amigdalită cronică decompensată și la 100,0% din copiii cu patologii asociate (amigdalită cronică decompensată cu patologie reumatoidă), fapt ce demonstrează că utilizarea mai multor

15 concentrații optimizate ale PEG permite identificarea unui număr mai mare de indicatori cu valoare de diagnostic în stadiul precoce al bolii, respectiv asigură inițierea oportună a unui tratament adecvat. Important este faptul că utilizand metoda propusă este posibilă identificarea bolnavilor cu intoxicație endogenă foarte înaltă: 13,8% din copiii bolnavi de amigdalită cronică compensată, 46,2% din copiii bolnavi de amigdalită cronică decompensată și 69,3% din copiii cu patologii asociate (amigdalită cronică decompensată cu patologie reumatoidă), ceea ce nu a fost

20 posibil la aplicarea soluției apropiate și a celei mai apropiate soluții.

Au fost investigați 198 donatori de diferite vârste și gen (grupul 1) și 107 copii de diferite vârste și gen, dintre care 29 cu amigdalită cronică compensată (grupul 2), 39 cu amigdalită cronică decompensată (grupul 3) și 39 cu amigdalită cronică decompensată complicată cu

25 patologie reumatoidă (grupul 4).
Concentrația CIC (tab. 3) cu masă moleculară mare (PEG 2,5%), care manifestă toxicitate mică, a fost la același nivel ca și la cei sănătoși la bolnavii din grupul 2, iar la bolnavii din grupul 3 și 4 a fost semnificativ mai mare comparativ cu cei sănătoși ($p < 0,001$ în ambele cazuri).

Concentrația CIC cu masă moleculară medie (PEG 4,2%), care manifestă toxicitate medie, a fost la același nivel ca și la cei sănătoși la bolnavii grupului 2, iar la bolnavii grupului 3 și 4 a fost semnificativ mai mare comparativ cu cei sănătoși ($p < 0,05$ și corespunzător $p < 0,001$). Cea mai mică concentrație a CIC a fost la bolnavii din grupul 2, mai mare, însă nesemnificativ comparativ cu grupul 2, a fost la bolnavii din grupul 3 și semnificativ mai mare comparativ cu grupul 2 și 3 s-a constatat la grupul 4 ($p < 0,001$ în ambele cazuri).

Concentrația complexelor imune circulante cu masă moleculară mică (PEG 8%), care manifestă toxicitate înaltă, a fost semnificativ mai înaltă decât la cei sănătoși la toți bolnavii grupurilor 2, 3 și 4 ($p < 0,001$ corespunzător). Cea mai mică concentrație a CIC a fost la bolnavii din grupul 2, mai mare statistic comparativ cu grupul 2 a fost la bolnavii din grupul 3 ($p < 0,001$) și semnificativ mai înalt la bolnavii din grupul 4 comparativ cu bolnavii grupurilor 2 și 3 ($p < 0,001$ în ambele cazuri).

40 Astfel, s-a demonstrat că la bolnavii mai severi (grupurile 3 și 4) s-a apreciat majorarea concentrației complexelor imune circulante în cele 3 fracții, fapt ce mărturisește o intoxicație mai severă la acești bolnavi.

Concentrația CIC cu masă moleculară medie (PEG 4,2%) și valorile CTT (coeficientul total de toxicitate) s-au modificat în paralel, adică s-au apreciat diferențe semnificative între grupurile 2 și 4 ($p < 0,001$) și grupurile 3 și 4 ($p < 0,001$).

Tabelul 5

Indicatorii ($M \pm m$) investigațiilor copiilor cu diferite forme de amigdalită cronică

Indicatori	Sănătoși	Amigdalită cronică compensată	Amigdalită cronică decompensată	Amigdalită cronică decompensată cu reumopatologie
	1	2	3	4
CIC-2,5% UC	6,3 $\pm$ 0,33	8,0 $\pm$ 1,08 $\diamond$	18,3 $\pm$ 1,42 $\square$	27,4 $\pm$ 1,03 $\bullet$
CIC-4,2% UC	27,3 $\pm$ 2,69	31,6 $\pm$ 3,13 $\diamond$	36,0 $\pm$ 2,43 $\square$	58,4 $\pm$ 1,61 $\bullet$
CIC-8,0% UC	121 $\pm$ 3,2	190 $\pm$ 17,8 $\square$ $\diamond$	408 $\pm$ 25,2 $\square$	559 $\pm$ 16,3 $\bullet$
CTT UC		2,82 $\pm$ 0,276 $\diamond$	5,04 $\pm$ 0,298	5,77 $\pm$ 0,153 $\bullet$

$\square$ – diferență semnificativă între sănătoși și bolnavi

$\diamond$ – diferență semnificativă între grupurile de bolnavi 2 și 3

◇ – diferență semnificativă între grupurile de bolnavi 2 și 4

● – diferență semnificativă între grupurile de bolnavi 3 și 4

5 Dacă concentrația CIC cu masă moleculară mică (PEG 8%) și masă moleculară mare (PEG 2,5%) în toate cele trei grupe se diferențiau statistic, atunci conform coeficientului de toxicitate, diferențe semnificative s-au determinat între grupurile 2 și 3 ($p < 0,001$), de asemenea 2 și 4 ($p < 0,001$). Între grupurile 3 și 4 modificări semnificative nu s-au depistat.

Coeficientul total al toxicității a fost diferit semnificativ între grupurile 2 și 3 ($p < 0,001$), 2 și 4 ($p < 0,001$), de asemenea între grupurile 3 și 4 ($p < 0,05$).

10 Astfel, a fost demonstrat că la bolnavii mai severi (din grupurile 3 și 4) conform coeficientului de toxicitate se apreciază o creștere semnificativă a concentrației CIC cu toate masele moleculare, ceea ce indică o intoxicație endogenă mai severă la acești bolnavi.

Exemple concrete de realizare

Exemplul 1

15 Bolnavul TV, 14 ani. Diagnostic: amigdalită cronică decompensată complicată cu artrită de reacție pe fond de derivați intestinali.

Concentrația CIC cu masă moleculară mică, medie și mare (PEG 2,5% - 28; PEG 4,2% - 60; PEG 8,0% - 499) a fost cu mult mai mare ca la cei sănătoși din același grup de vârstă (7,0; 27,1; 134). Coeficientul total de toxicitate (CTT) a fost de asemenea mai mare la bolnavi 5,49 în comparație cu subiecții sănătoși - 4,96 din aceeași grupă de vârstă.

20

Indicatori		Sănătoși	Indicatorii bolnavului	Raportul: bolnav/subiect sănătos
CIC-2,5%	UC	7,0±0,74	28	4
CIC-4,2%	UC	27,1±1,46	60	2,2
CIC-8,0%	UC	134±8,3	499	3,72
CTT	UC	4,96	5,94	1,20
Leucocite	10 ⁹ /l	7,4	12,9	1,74
N.segmentate	%	55	63	1,15
N.nesegmentate	%	1	5	5
Limfocite	%	35	18	0,51

25 Analiza leucoformulei la bolnavul dat, în comparație cu norma vârstnică a lui, a arătat prezența unui nivel înalt de leucocite (de 1,74 ori mai mare ca norma), nivel înalt al neutrofilelor segmentate (de 1,15 ori mai mare ca norma), nivel înalt al neutrofilelor nesegmentate (de 5 ori mai mare ca norma) și o scădere pronunțată a nivelului de limfocite (aproximativ de 2 ori), ce demonstrează o deviere pronunțată a formulei leucocitare spre stânga sau o intoxicație pronunțată a organismului. Rezultatele obținute confirmă nivelul înalt de intoxicație, care se depistează cu ajutorul metodei revendicate.

Exemplul 2

30 Bolnavul ȘA, 5 ani. Diagnostic: amigdalită cronică decompensată.

Indicii		Sănătoși	Indicatorii bolnavului	Raportul: bolnav/subiect sănătos
CIC-2,5%	UC	3,5±0,27	8	2,29
CIC-4,2%	UC	18,7±0,68	39	2,09
CIC-8,0%	UC	86±2,55	145	1,69
CTT	UC	4,55	4,02	0,88
Leucocite	10 ⁹ /l	9,2	10,9	1,18
N.segmentate	%	36	40	1,11
N.nesegmentate	%	2,8	6	2,14
Limfocite	%	51	46	0,90

35 Concentrația CIC cu masă moleculară mică, medie și mare (PEG 2,5% - 8; PEG 4,2% - 39; PEG 8,0% - 145) a fost cu mult mai mare ca la subiecții sănătoși din același grup de vârstă (3,5; 18,7; 86). Coeficientul total de toxicitate (CTT) de asemenea nu a fost mărit (la bolnav 4,02, la subiecții sănătoși 4,55) comparativ cu copiii sănătoși din aceeași grupă de vârstă. Astfel, la bolnavul dat s-a apreciat o intoxicație endogenă medie.

Analiza leucoformulei la bolnavul dat, în comparație cu norma vârstnică a lui, a arătat prezența unui nivel mai scăzut de leucocite (de 1,18 ori mai mare ca norma), de neutrofile segmentate (de 1,11 ori mai mare ca norma) și de neutrofile nesegmentate (de 2,14 ori mai mare ca norma), precum și o scădere nepronunțată a nivelului de limfocite, în comparație cu primul exemplu, ce demonstrează o deviere nepronunțată a formulei leucocitare spre stânga sau o intoxicație a organismului de nivel mediu. Rezultatele obținute confirmă nivelul mediu de intoxicație, care se depistează cu ajutorul metodei revendicate.

Exemplul 3

Bolnavul ZN, 10 ani. Diagnostic: amigdalită cronică decompensată.

Indici		Sănătoși	Indicatorii bolnavului	Raportul: bolnav/subiect sănătos
CIC-2,5%	UC	5,3±0,46	24	4,5
CIC-4,2%	UC	23,9±0,91	21	0,9
CIC-8,0%	UC	118±4,2	149	1,26
CTT	UC	4,88	3,74	0,77
Leucocite	10 ⁹ /l	8,4	8,8	1,04
N.segmentate	%	43,8	44	1,00
N.nesegmentate	%	1,78	3	1,68
Limfocite	%	45	43	0,95

Concentrația CIC cu masă moleculară mică, medie și mare (PEG 2,5% - 24; PEG 4,2% - 38; PEG 8,0% - 234) a fost cu mult mai mare ca la subiecții sănătoși din același grup de vârstă. Dar, analizând bolnavul conform coeficienților de toxicitate, CTT de asemenea nu a fost mărit (la bolnav 3,74, la subiecții sănătoși 4,88) comparativ cu copiii sănătoși din aceeași grupă de vârstă. Astfel, la bolnavul dat s-a apreciat o intoxicație endogenă mică.

Analiza leucoformulei la bolnavul dat, în comparație cu norma vârstnică a lui, a arătat prezența nivelului de leucocite aproape de normă (de 1,04 ori mai mare ca norma), nivelul neutrofilelor segmentate fiind același ca la persoanele sănătoase, un nivel mai scăzut al neutrofilelor nesegmentate (de 1,68 ori mai mare ca norma) și același nivel de limfocite, ca la persoanele sănătoase, în comparație cu exemplul doi, ce demonstrează o deviere minimală a formulei leucocitare spre stânga sau o intoxicație de nivel minim a organismului.

(56) Referințe bibliografice citate în descriere:

1. Гриневич Ю. А., Алферов А. Н. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных. Лабораторное дело, 1981, №8, p.493-494
2. RU 2415430 C1 2011.03.27

(57) Revendicări:

Metodă de determinare a gradului de intoxicație endogenă la copiii cu amigdalită cronică, care constă în aceea că se colectează sânge, se separă serul sangvin și se introduc câte 50 μl de ser în trei eprubete, la care se adaugă câte 100 μl de soluție tampon boric și soluție de polietilenglicol (PEG) de 2,5%, 4,2% și 8,0%, iar în a patra eprubetă de control se introduc 50 μl de ser și 100 μl de soluție tampon boric, apoi eprubetele se incubează pentru 15 min la temperatura camerei, după care se determină densitatea optică la lungimea de undă de 340 nm, iar concentrația complexelor imune circulante (CIC) în fiecare eprubetă se determină conform formulei:

$$CIC = DOEDS - DOEDC \cdot 1000,$$

unde:

DOEDS – densitatea optică în eprubeta de studiu, în UC;

DOEDC – densitatea optică în eprubeta de control, în UC,

în cazul în care în eprubeta cu concentrația PEG 2,5% CIC este mai mare de 10 UC, cu concentrația PEG 4,2% CIC este mai mare de 40 UC și cu concentrația PEG 8,0% CIC este mai mare de 240 UC se diagnostichează un grad înalt de intoxicație endogenă, în cazul în care în eprubeta cu concentrația PEG 2,5% CIC este mai mic de 10 UC, cu concentrația PEG 4,2% CIC este mai mic de 40 UC și cu concentrația PEG 8,0% CIC este mai mic de 240 UC – un grad mediu de intoxicație endogenă, iar în cazul în care în eprubeta cu concentrația PEG 2,5% CIC este mai mare de 10 UC, cu concentrația PEG 4,2% CIC este mai mic de 40 UC și cu concentrația PEG 8,0% CIC este mai mic de 240 UC – un grad minim de intoxicație endogenă.

Șef adjunct Direcție Brevete :

IUSTIN Viorel

Șef Secție Examinare:

LEVIȚCHI Svetlana

Examinator:

LUPAȘCU Lucian

RAPORT DE DOCUMENTARE

I. Datele de identificare a cererii		
(21) Nr. depozit: s 2015 0021 (22) Data depozit: 2015.03.19 (71) Solicitant: IMSP INSTITUTUL DE FTIZIOPULMONOLOGIE "CHIRIL DRAGANIUC", MD (54) Titlul: Metodă de determinare a gradului de intoxicație endogenă la copii cu amigdalită cronică		
II. Clasificarea obiectului invenției:		
(51) Int.Cl: G01N 33/52 (2006.01)		
III. Colecții și Baze de date de brevete cercetate (denumirea, termeni caracteristici, ecuații de căutare reprezentative)		
MD - Intern « Documentare Invenții » (inclusiv cereri nepublicate; trunchiere automată stanga/dreapta): „Intoxicație endogenă”, “polietilenglicol” Int.Cl: G01N 33/52 (2006.01) EA, CIS (Eapatis): „Эндогенная интоксикация”, “полиэтиленгликоль” Int.Cl: G01N 33/52 (2006.01) SU (nonpublic): „Эндогенная интоксикация”, “полиэтиленгликоль” Int.Cl: G01N 33/52 (2006.01)		
IV. Baze de date și colecții de literatură nonbrevet cercetate		
http://old.ms.gov.md/_files/14480-PCS%2520Intoxicatiile%2520acute%2520exogene%2520la%2520copil%2520-%2520aprobat%2520prin%2520ordin.pdf http://library.usmf.md/old/downloads/ebooks/Urgente_medicale_ghid_practic_Crivceanshii_2009/Capitolul_VI_p.(298-329).pdf		
V. Documente considerate a fi relevante		
Categorია*	Date de identificare ale documentelor citate si, unde este cazul, indicarea pasajelor pertinente	Numărul revendicării vizate
A	Danilov Lucian, Ghinda Serghei, Ababii Ion, Revenco Ninel, Chiroșca Valentina. Caracteristica Reactivității imune la bolnavii cu diverse forme de amigdalită cronică asociată cu patologie reumatică. Arta Medica Nr.2, 2014, p19-24	1
A	MD 805 Y 2014.08.31	1
A, D	Гриневич Ю. А., Алферов А. Н. Определение иммунных комплексов в крови онкологических больных. Лабораторное дело, 1981, №8, p.493-494	1
A, D, C	RU 2415430 C1 2011.03.27	1
* categoriile speciale ale documentelor citate:		
A – document care definește stadiul anterior general	T – document publicat după data depozitului sau a priorității invocate, care nu aparține stadiului	

	pertinent al tehnicii, dar care este citat pentru a pune în evidență principiul sau teoria pe care se bazează invenția
X – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată nouă sau implicând activitate inventivă când documentul este luat în considerație de unul singur	E – document anterior dar publicat la data depozit național reglementar sau după aceasta dată
Y – document de relevanță deosebită: invenția revendicată nu poate fi considerată ca implicând activitate inventivă când documentul este asociat cu unul sau mai multe documente de aceeași categorie	D – document menționat în descrierea cererii de brevet
O - document referitor la o divulgare orală, un act de folosire, la o expoziție sau la orice alte mijloace de divulgare	C – document considerat ca cea mai apropiată soluție
	& – document, care face parte din aceeași familie de brevete
P - document publicat înainte de data de depozit, dar după data priorității invocate	L – document citat cu alte scopuri
Data finalizării documentării	
2015.06.19	
Examinator	
LUPĂȘCU Lucian	