

Ministerul Sănătății Publice

Metodologie din 16/01/2008

Publicat în Monitorul Oficial, Partea I nr. 64 din 28/01/2008

Metodologie specifică pentru screeningul biologic al populației în expunerea la plumb

I. Etapa 1: Identificarea și clasificarea orașelor și aglomerărilor din România în care poluarea mediului cu plumb prezintă un risc semnificativ pentru sănătatea populației

1. După mărimea localității - numărul populației:

- a) orașe/aglomerări mai mari de 500.000 de locuitori;
- b) orașe/aglomerări mai mari de 250.000 de locuitori;
- c) orașe/aglomerări mai mici de 250.000 de locuitori;

2. Identificarea surselor semnificative de poluare cu plumb a mediului de viață al localităților:

- a) traficul auto;
- b) industriale (metalurgie neferoasă, topitorii, exploatarea miniere etc);
- c) obiceiuri locale, mici meșteșugari;
- d) altele.

3. Identificarea principalilor factori de mediu afectați:

- a) aer atmosferic;
- b) sol;
- c) apa potabilă;
- d) alimente, altele.

4. Evaluarea preliminară a expunerii:

- a) evaluarea datelor de mediu existente cu privire la concentrațiile plumbului în mediile identificate la pct. 3;
- b) date din ultimii 5 ani (pe cât posibil).

5. Identificarea grupelor critice populaționale cu expunere semnificativă la plumb:

- a) identificarea numărului, procentului de populație expusă, pentru fiecare situație;
- b) identificarea de grupe populaționale susceptibile - grupe critice (nou-născuți, copii cu vârsta cuprinsă între 0-6 ani în special, femeii gravide).

II. Etapa a 2-a: Identificarea loturilor populaționale în vederea screeningului biologic din cadrul orașelor și aglomerărilor selecționate în etapa 1

Loturile:

1. număr total (cel puțin 100 în orașele mai mari de 250.000 de locuitori), din care grupuri critice:

- nou-născuți;
- copii cu vârsta cuprinsă între 0-6 ani;
- femei gravide.

2. Se vor investiga persoanele care se oferă voluntar și care și-au dat consimțământul în scris pentru a putea fi recoltate probele biologice. De asemenea, se va cere acordul scris pentru a folosi datele din chestionar în conformitate cu prevederile legale în vigoare. În cazul copiilor este nevoie de consimțământul scris al părinților.

3. Criterii de excludere din lot: expunerea profesională la plumb la locul de muncă.

III. Etapa a 3-a: Investigațiile medicale

1. Chestionarul:

a) chestionarul de evaluare a condițiilor de viață și muncă și de evaluare a stării de sănătate preexistente, elaborat de către Institutul de Sănătate Publică București (ISPB), prevăzut la anexa nr. 4 la prezenta metodologie;

b) va fi completat pentru fiecare persoană investigată.

2. Screeningul populațional:

a) metoda de referință - plumbemia:

- metoda de laborator de referință - spectrofotometrie de absorbție atomică - din sânge venos;
- metoda alternativă - kituri de testare rapidă, sânge venos sau capilar, de echivalat de către ISPB.

b) metode alternative și/sau adiționale de screening: determinarea activității dehidratazei acidului delta-aminolevulinic - delta-aminolevulinic dehidrataza (ALAD), conform anexelor nr. 1, 2 și 3 la prezenta metodologie;

c) toate recoltările de probe biologice vor fi însoțite de fișe de identificare;

d) toate recoltările biologice vor fi executate în condiții de maximă siguranță și securitate sanitară, cu respectarea eticii și deontologiei profesionale, a confidențialității datelor și cu respectarea normelor de siguranță și securitate sanitară în prelevarea probelor.

3. Posibile evaluări suplimentare:

- măsurători somatometrice, tensiune arterială, teste de dezvoltare neuropsihică (WISC - QI, Bender - Santuci, timpul de reacție auditiv și vizual)

IV. Identificarea laboratoarelor care vor efectua analizarea probelor și stabilirea programului de asigurarea calității:

a) identificarea laboratoarelor din cadrul orașelor și aglomerărilor identificate în etapa 1, care pot analiza în condiții optime plumbemia și/sau ALAD;

b) în cazul în care nu se identifică laboratoare în orașele și aglomerările identificate în etapa 1, se trece la identificarea de laboratoare alternative în așa fel încât să se poată asigura conservarea și transportarea probelor în condiții optime;

c) la nivelul ISPB se va asigura controlul de calitate al probelor biologice, plumbemie și ALAD și exerciții de intercomparare între laboratoarele selecționate.

V. Organizarea de campanii de screening de către autoritățile de sănătate publică județene (ASPJ) în colaborare cu ISPB

VI. Prelucrarea și centralizarea datelor din campanie, elaborarea rapoartelor pentru fiecare campanie de către ASPJ în colaborare cu ISPB

VII. Transmiterea datelor centralizate către ISPB pentru întocmirea raportului național și înaintarea acestuia către Ministerul Sănătății Publice

ANEXA Nr. 1
la metodologie

RELAȚIA DOZĂ-EFECT

Procentele plumbemiei reținute pentru evaluarea rezultatelor supravegherii biologice rezultă din analizarea datelor științifice privind diferitele efecte toxice ale plumbului. Această analiză, care ține seama de variațiile normale ale valorilor biologice ale populației, permite stabilirea unor relații cvasicantitative între doză și efect. Următoarele relații doză-efect sunt reținute ca bază de referință pentru aplicarea metodologiei:

- a)** o descreștere a activității ALAD în globulele roșii, ca urmare a unei expuneri la plumb, atât cât să nu aibă loc o perturbare în hematopoieză, poate fi acceptată pentru populație. Pentru plumbemiile mai mici de 15-20 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$, se consideră în prezent că descreșterea activității ALAD nu produce perturbări în hematopoieză;
- b)** creșterea protoporfirinelor eritrocitare (PPE) în sânge indică o interferență cu utilizarea fierului, inhibând astfel sinteza hemului. Creșterea PPE intervine pentru procentele de plumbemie mai mari de 20-30 $\mu\text{g}/100\text{ml}$. O creștere a PPE se poate datora totuși și altor cauze;
- c)** interferența cu sinteza glutathionului nu poate fi tolerată decât la un mic segment al populației și numai în măsura în care aceasta este slabă și nu produce alte manifestări subclinice. Această interferență inacceptabilă cu sinteza glutathionului nu intervine atunci când valorile plumbemiei sunt sub 30 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$;
- d)** creșterea semnificativă în secrețiile urinare a acidului delta-aminolevulinic (ALAU) este un semn al perturbării importante a metabolismului porfirinelor și constituie astfel un semn de sănătate deficientă. Creșterea semnificativă din punct de vedere statistic a ALAU nu intervine decât pentru valori ale plumbemiei mai mari de 35 $\mu\text{g}/100\text{ ml}$.

ANEXA Nr. 2
la metodologie

CORESPONDENȚA dintre procentele plumbemiei și activitatea enzimatică

Correspondența dintre procentele plumbemiei și activitatea enzimatică a ALAD, măsurată după metoda europeană standardizată, conform anexei nr. 3 la metodologie, este următoarea:

Plumbemie ($\mu\text{g}/100\text{ ml}$ sânge)	ALAD (unități/litru)
35	20
30	25
20	35

Atât timp cât valorile măsurate ale ALAD sunt într-un mod semnificativ superioare limitelor de mai sus pentru diferite segmente de populație, nu este necesar să se efectueze noi măsurări ale procentelor de plumbemie în vederea confirmării.

ANEXA Nr. 3
la metodologie

PRESCRIȚII TEHNICE privind determinarea activității ALAD

Metoda europeană standardizată pentru determinarea activității dehidratazei acidului delta-aminolevulinic

Principiul metodei adoptate pentru determinarea activității dehidratazei acidului delta-aminolevulinic este bine cunoscut. El se bazează pe incubația enzimei cu un exces de substrat de acid delta-aminolevulinic. Porfobilinogenul format după un timp determinat este amestecat cu reactivul lui Ehrlich modificat și culoarea obținută este măsurată cu ajutorul unui fotometru față de alb. Cantitatea de porfobilinogen produs indică activitatea ALAD.

Metoda

Efectul luminii

Experiențele recente au arătat că porfobilinogenul mai ales este foarte sensibil la lumină. Întreaga analiză ar trebui să fie realizată în absența oricărei lumini solare directe în laborator (nu numai în locul în care se efectuează analiza).

Prima fază - Prelevarea probelor de sânge și conservarea înaintea analizei:

- se ia o probă de sânge de 2 ml sânge venos cu ajutorul unei seringi din plastic (nestabilizată la plumb) în prezența heparinei uscate (< 5 mg);
- se prepară imediat 4 prelevări de 0,2 ml repartizate în tuburi de plastic (nestabilizate la plumb) și se răcesc la temperatura de 4°C. Pipetarea se efectuează cu pipete gradate de tip Marburg;
- dacă analiza se efectuează într-un interval de 3 ore, nu este necesară răcirea probelor;
- durata maximă de păstrare a probelor la temperatura de 4°C este de 24 de ore;
- chiar înainte de analiză, probele trebuie introduse într-o baie de apă foarte rece timp de 10 minute.

Observație: Printre materialele plastice cităm polietilena, polistirenul și polipropilena. Durata păstrării de 24 de ore la temperatura de 4°C rezultă dintr-o estimare prudentă. Acest interval de timp este suficient pentru a permite transportul probei din locul în care s-a făcut prelevarea la un laborator central, în vederea analizei. Dintre cele 4 prelevări de sânge 3 trebuie să fie folosite pentru determinarea ALAD și una drept probă-martor.

A doua fază - Determinarea hematocritului:

Această determinare trebuie să fie efectuată:

- în același timp cu proba de sânge;

- printr-o metodă capilară folosind două probe.

Se centrifughează după închiderea unei extremități la o viteză de cel puțin 30.000 de rotații pe minut (nu mai puțin de 5 minute).

Observație: Această determinare trebuie, de preferință, să se realizeze pe loc, dar la mai puțin de 24 de ore de la prelevarea probei de sânge. Se utilizează, dacă este posibil, o centrifugă microhematocrită.

A treia fază - Hemoliza:

- se hemolizează 3 probe de sânge dezghețate în prealabil cu 1,3 ml apă distilată (adusă în prealabil la temperatura de 37°C) timp de 10 minute la temperatura de 37°C ± 0,2°C;

- se adaugă apă, de preferință cu ajutorul unei pipete gradate de 2 ml, apoi se amestecă bine;

- în acest stadiu probele nu se mai agită.

Observație: S-a decis folosirea de apă și nu de Triton X 100 pentru hemoliză. Experiențele de hemoliză cu Triton X 100 conduc la o frânare considerabilă a activității ALAD, care nu a putut fi încă explicată și care ar putea corespunde unui artefact.

A patra fază - Adăugarea soluției de ALA la hemoliză:

- se prepară soluția de ALA;

- ea nu trebuie preparată cu mai mult de 5 ore înainte;

- se aduce această soluție la temperatura de 37°C timp de 10 minute înaintea adăugării;

- se adaugă 1 ml din această soluție hemolizată, de preferință cu ajutorul unei pipete cu bulă de 1 ml, apoi se amestecă.

Observație: A fost stabilit un pH de 6,4, experiențele demonstrând că la această valoare a pH-ului corespunde cea mai bună corelație dintre activitățile ALAD și procentele plumbemiei pentru populațiile normale. Nu este vorba de a se obține un maximum de activitate (realizabil prin ridicarea pH-ului), deoarece activitățile de determinat sunt suficient de importante.

A cincea fază - Prepararea matorului:

- 0,2 ml de sânge tratat ca pentru determinarea ALAD până în momentul adăugării soluției de ALA; în locul acesteia se adaugă 1 ml de soluție de HgCl₂-TCA, apoi 1 ml de soluție de ALA și se procedează mai departe la fel ca pentru determinarea ALAD (vezi mai jos);

- pentru adăugarea menționată mai sus se folosesc pipete pentru suflat.

Observație: Doar un singur mator este comparat cu o serie de 3 încercări pentru fiecare eșantion de sânge. Dacă densitatea optică obținută pentru mator este prea mare, se va repeta operația pentru control.

A șasea fază - Incubația:

- 60 de minute la temperatura de 37°C ± 0,2°C în bain-marie;

- timpul de incubație pornește de la adăugarea soluției de ALA.

Observație: Timpul de incubație de 60 de minute a fost ales pentru a crește în mod natural activitatea ALAD, dat fiind că nicio altă fază nu a avut ca efect creșterea artificială a activității. Experiențele au arătat că relația timp de incubație-activitate este liniară pentru intervalele de timp care depășesc două ore.

Temperatura de incubație a fost menținută la temperatura de 37°C din motive practice.

A șaptea fază - Oprirea reacției PBG:

- se adaugă 1 ml de soluție de HgCl₂-TCA la amestecul de incubație, de preferință cu o pipetă de suflat cu bulă de 1 ml.

A opta fază - Centrifugarea și filtrarea:

- 30.000 de rotații pe minut;

- filtrare cu hârtie Whatman nr. 54 sau echivalentă (rezistentă la acid).

Observație: Centrifugarea trebuie să dureze aproximativ 10 minute.

Faza de filtrare a fost introdusă în scopul de a evita pipetarea particulelor mici pe suprafața lichidului de deasupra. Se pare că aceste particule produc o reacție colorată cu reactivul lui Ehrlich. Mai multe încercări au arătat că introducerea fazei de filtrare îmbunătățește reproductibilitatea. La nevoie, faza de filtrare poate fi înlocuită de o a doua centrifugare.

A noua fază - Reacția cu reactivul lui Ehrlich:

- se amestecă 1 ml de lichid de deasupra cu 1 ml din reactivul lui Ehrlich modificat, folosind pipete cu bulă;

- se amestecă cu ajutorul unui amestecător de tip Vortex pentru a asigura omogenitatea;

- se lasă să reacționeze timp de 5 minute înainte de a măsura extincția.

Observație: Pentru a asigura omogenitatea este important să se urmărească amestecarea intimă a lichidului de deasupra cu reactivul lui Ehrlich.

A zecea fază - Măsurarea extincției:

- se etalonează spectrofotometrul cu ajutorul unei soluții de fenoltaleină într-un tampon alcalin;

- măsurarea extincției probei în raport cu matorul de 555 nm într-o celulă de 1 cm (sau de 2 cm dacă absorbția este foarte slabă).

A unsprezecea fază - Calculul activității enzimice:

- ecuația care permite calculul activității este următoarea:

$$\frac{OD \text{ corr.} \times 35 \times 2 \times 100 \times K}{Hct \% \times 60 \times 62} = \mu \text{ moli ALA/mn/ml RBC} = U/ml,$$

în care:

OD - extincția măsurată;

60 - timpul de incubație;

35 - factorul de diluție;

62 - coeficientul molar al extincției în cm³/μmol;

K - coeficientul de corecție spectrofotometrică.

Observație: Unitățile propuse sunt conforme cu recomandările referitoare la nomenclatorul enzimelor al Uniunii Internaționale de Biochimie.

SOLUȚII

1. Prepararea unei soluții de ALA

Soluția A:

- 1,78 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ dizolvată în 100 ml de apă distilată (de preferință prin deionizare

Soluția B:

- 1,38 g de $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ dizolvată în 100 ml de apă distilată;

- 29 ml de soluție A + 71 ml de soluție B dau un tampon de 0,1 M de fosfat de Na la pH 6,4.

Această forță ionică a tamponului este necesară pentru a împiedica orice variație a pH-ului în soluția de reacție;

- 167,6 mg de ALA-HCl sunt dizolvate în soluția B (aceasta fiind mereu acidă); pH-ul este ajustat la 6,4 cu ajutorul soluției A.

Volumul este apoi adus la 100 ml cu soluția tampon de 0,1 M fosfat de Na la pH 6,4. Această preparare dă o soluție de 0,01 M de ALA.

2. Soluția de HgCl_2 -TCA:- 1,35 g de HgCl_2 sunt dizolvate în 100 ml de acid tricloracetic 10%.**3. Soluția de reactiv al lui Ehrlich**

Reactivi:

- 2,5 g de dietilaminobenzaldehidă (pDMAB);

- 0,25 g de HgCl_2 dizolvate în 10 ml de acid acetic glacial;

- acid percloric cu masa specifică de 1,7;

- acid acetic glacial.

Preparare:

Se dizolvă pDMAB în 50 ml de acid acetic glacial, se adaugă 24,5 ml de acid percloric și 4 ml de HgCl_2 . Se amestecă, se răcește și se aduce la 100 ml cu acid acetic glacial într-un balon cotat¹⁾. Se păstrează într-un flacon de culoare închisă.¹⁾ Dacă în această fază apare o culoare brună, reactivul trebuie aruncat.**ANEXA Nr. 4**
la metodologie

ID

JUDEȚUL

LOCALITATEA

Instrucțiuni de completare a chestionarului:

Acest chestionar cuprinde întrebări referitoare la persoana examinată (anumite întrebări se referă cu precădere la copiii investigați), caracteristicile locuinței, traficului din zona rezidențială. Vă rugăm să completați în întregime chestionarul, iar în cazul copiilor este de preferat să se completeze de către mama copilului.

La majoritatea întrebărilor se va răspunde prin bifarea/încercuirea răspunsului corect sau prin scrierea pe o linie punctată.

Numele și prenumele

Vârsta ani Sexul: masculin/feminin

Adresa: localitatea, codul poștal

sectorul, str. nr.

Număr de telefon de contact

A. ÎNTREBĂRI GENERALE

A1. Locul și data nașterii:

Localitatea, județul, ziua, luna, anul

A2. De cine este completat chestionarul (în cazul copiilor):

1. mamă

2. tată

3. bunici

4. alții

A3. Data completării chestionarului:

Ziua luna anul

A4. De cât timp locuiți la adresa din prezent?

1. mai puțin de 3 ani

2. peste 3 ani

3. de la naștere

A5. De cât timp locuiți la prezenta adresă?

1. dinaintea sarcinii cu acest copil

2. după nașterea acestui copil

B. ÎNTREBĂRI REFERITOARE LA LOCUINȚĂ ȘI LOCATARI

B1. Când a fost construită locuința dumneavoastră?

1. cu mai mult de 50 de ani în urmă

2. între 50-10 ani în urmă

3. cu mai puțin de 10 ani în urmă

B2. Pe ce tip de stradă este situată locuința dumneavoastră? (bifați o variantă)

1. stradă laterală de cartier

2. stradă principală de cartier

3. arteră principală a orașului/localității

4. drum regional

5. autostradă

B3. Ce tip de autovehicule circulă în zona dumneavoastră rezidențială? (bifați toate variantele)

1. autoturisme

2. autobuze

3. alte mijloace de transport în comun, specificați

4. camioane, mașini mari

5. toate tipurile

B4. Cum apreciați intensitatea traficului pe strada pe care locuiți? (bifați o variantă)

1. foarte intens ziua

2. intensitate medie

3. intensitate moderată

4. intensitate redusă

B5. Cum este amplasată locuința în care locuiți?

1. despărțită de stradă prin spațiu verde

2. despărțită de stradă prin alt spațiu (de exemplu, teren viran)

3. la stradă

B6. Menționați dacă se curăță de praf/se spală strada pe care locuiți:

DA/NU

B7. Câte camere de locuit are locuința dumneavoastră? camere

B8. Câte persoane stau permanent în locuință? persoane

B9. În cazul copiilor, cu cine locuiește copilul în cameră?

1. singur

2. cu o persoană

3. cu mai multe persoane

B10. Unde este amplasată camera în care vă petreceți cea mai mare parte a timpului?

1. spre curte/spațiu verde

2. spre stradă/trafic

B11. Cât de des aerisiți camera în care vă petreceți cea mai mare parte a timpului?

1. zilnic

2. săptămânal

3. mai rar

B12. Când obișnuiți să aerisiți camera?

1. dimineața

2. la prânz

3. după-amiază/seara

B13. Obișnuiți să aspirați praful din locuință?

1. zilnic

2. săptămânal

3. lunar

4. mai rar

B14. Obișnuiți să ștergeți praful cu o cârpă udă?

1. zilnic

2. săptămânal

3. lunar

4. mai rar

B15. În cazul copiilor, cât timp petrece copilul la joacă în fața casei?

1. mai puțin de două ore

2. între două și 4 ore

3. între 4 și 6 ore

4. peste 6 ore

B16. În cazul copiilor, unde obișnuiește să se joace copilul?

1. în zone special amenajate

2. în zone cu spațiu verde

3. în zone virane

4. în apropierea zonelor cu trafic intens

B17. Obișnuiește copilul să se joace cu nisip/pământ, în sezonul de primăvară/vară/toamnă?

DA/NU

B18. Specificați dacă copilul își petrece o parte din timp în următoarele condiții:

a) pe timpul creșei/grădiniței/școlii, la bunici sau în altă parte: DA/NU

b) pe timpul vacanțelor, la bunici sau în altă parte: DA/NU

B19. Există în locuință persoane care lucrează în mediu profesional cu expunere crescută la plumb?

B20. Cine sunt aceste persoane?

1. mama

2. tata

3. bunicii

4. alții

B21. Sunt asigurate la locul de muncă și folosite următoarele:

1. schimbarea hainelor la sfârșitul zilei de muncă

2. dușul la sfârșitul zilei de muncă

3. nu se practică aceste măsuri

B22. Există în locuință persoane care au lucrat sau lucrează în mediu profesional cu expunere crescută la plumb?

DA/NU

B23. Cine

În ce perioadă? De la data de până la

B24. În cazul utilizării de legume și fructe, spălați bine aceste produse înainte de consum?

DA/NU

B25. Cultivați legume, fructe în propria gospodărie?

DA/NU

B26. Unde cultivați legume, fructe?

1. departe de zone de trafic
2. în vecinătatea unor zone de trafic
3. în apropierea unor zone industriale de metalurgie neferoasă

B27. Obișnuiți să creșteți animale în propria gospodărie?

DA/NU

B28. Unde creșteți animale?

1. departe de zonele de trafic
2. în vecinătatea unor zone de trafic
3. în apropierea unor zone industriale de metalurgie neferoasă

B29. Vă spălați pe mâini ori de câte ori intrați în casă și înainte de fiecare masă (mai ales în cazul copiilor)?

DA/NU

B30. Obișnuiește copilul să ducă jucării murdare la gură (jucării căzute pe jos și nespălate)?

DA/NU

C. ÎNTREBĂRI DESPRE STAREA DE SĂNĂTATE A PERSOANEI INVESTIGATE/A COPILULUI INVESTIGAT

C1. În cazul copiilor, vi s-a comunicat vreodată de un medic că dezvoltarea fizică a copilului este deficitară?

DA/NU

C2. Ați fost diagnosticat vreodată (persoana investigată sau copilul chestionat) de către medic cu:

- a) anemie DA/NU
- b) lipsă de calciu DA/NU
- c) deficit proteic DA/NU

C3. Vi s-a comunicat vreodată de către educatoarea/profesorul copilului că acesta ar fi prezentat:

- a) iritabilitate, irascibilitate marcată DA/NU
- b) performanță intelectuală mai redusă DA/NU
- c) tulburări de comportament DA/NU

D. FACTORI EDUCAȚIONALI ȘI SITUAȚIA SOCIOECONOMICĂ

D1. Ce pregătire școlară are mama copilului sau persoana de sex feminin cu care locuiește copilul?

1. primară (clasele I-VIII)
2. școală profesională/tehnică
3. postliceală
4. liceu
5. superioară (universitate)

D2. Ce pregătire școlară are tatăl copilului sau persoana de sex masculin cu care locuiește copilul?

1. primară (clasele I-VIII)
2. școală profesională/tehnică
3. postliceală
4. liceu
5. superioară (universitate)

D3. Ce profesie are mama copilului sau persoana de sex feminin cu care locuiește copilul?

1. muncitor agricol
2. muncitor necalificat
3. muncitor semicalificat
4. muncitor calificat
5. tehnician
6. funcționar
7. administrator
8. specialist, funcționar superior

D4. Ce profesie are tatăl copilului sau persoana de sex masculin cu care locuiește copilul?

1. muncitor agricol
2. muncitor necalificat
3. muncitor semicalificat
4. muncitor calificat
5. tehnician
6. funcționar
7. administrator
8. specialist, funcționar superior

E. ÎNTREBĂRI REFERITOARE LA CREȘĂ/GRĂDINIȚĂ/ȘCOALĂ

E1. De cât timp frecventează copilul creșa/grădinița sau școala prezentă:

De ani luni

Vă mulțumim pentru colaborare.