

PATOLOGIA I TERAPIA

ZBIGNIEW POMORSKI

Obserwacje nad występowaniem alergii pokarmowej u psów – nadwrażliwość spowodowana alergenami mleka

Z Kliniki Chorób Wewnętrznych Instytutu Chorób Niezakaźnych Wydziału Weterynaryjnego AR w Lublinie

Mleko krowie uważane jest za jeden z najważniejszych spośród naturalnych alergenów pokarmowych człowieka. Spowodowane nim objawy alergiczne obserwowane są najczęściej u dzieci, choć niejednokrotnie można napotkać je i u dorosłych (1, 2, 7, 15, 16, 18—21). U zwierząt alergen ten posiada z wielu względów o wiele bardziej ograniczone znaczenie, a przypadki nietolerowania go odnotowywane były jedynie u psów i kotów (3, 4, 12, 14, 22—24). Budowie chemicznej oraz właściwościom alergizującym mleka krowiego poświęconych jest szereg prac (5, 6, 9, 13, 20), w których to wykazano, że odpowiedzialnymi za powstanie uczulenia są występujące w nim białka: kazeina, laktoalbumina oraz laktoglobulina.

W miarę lepszego poznania właściwości alergizujących białek mleka okazało się, że kazeina jest białkiem ciepłochwiejnym, o stosunkowo najslabszych (w porównaniu z pozostałymi) właściwościach uczulających. Nie posiada ona swoistości gatunkowej co znaczy, że jest wspólną dla wszystkich gatunków mleka, w związku z czym w przypadku uczulenia zamiast mleka krowiego na inne (kozie) okazuje się nieskuteczna. Laktoalbumina jest gatunkowo swoistą, ale cechuje się ciepłochwiejnością, co pozwala na podawanie w przypadku uczulenia mleka przegotowanego. Laktoglobulina uczula najsilniej (10, 11) i daje reakcje krzyżowe z globuliną surowicy bydłowej, w związku z czym można zaobserwować współistnienie uczulenia na mleko z nietolerancją mięsa wołowego.

Z uwagi na nieliczne dotychczasowe doniesienia oraz całkowity brak opracowań z tej dziedziny w weterynaryjnym piśmiennictwie krajowym, postanowiono przedstawić wyniki własnych, poczynionych na ten temat obserwacji z okresu ostatnich sześciu lat. Dotyczą one leczonych w tutejszej Klinice psów, u

których jako odpowiedzialną za całość kształt prezentowanych zaburzeń rozpoznano nietolerancję w stosunku do antygenów mleka.

Badania kliniczne. W dokonanych obserwacjach, prowadzonych na psach chorujących z objawami alergii, na podstawie wywiadów, badań klinicznych oraz analiz dodatkowych ustalono, że w czternastu przypadkach przyczyną obserwowanych zaburzeń była nietolerancja mleka krowiego. W większości alergizacja ta występowała u zwierząt młodych, których wiek nie przekroczył drugiego roku życia (tab. 1).

Tab. 1. Rasy, liczba oraz wiek testowanych psów

Rasa	Liczba	Wiek	
		do 2 lat	powyżej 2 lat
Owczarek niemiecki	5	1	4
Mieszaniec	4	4	0
Terier	3	3	0
Pudiel	1	1	0
Wyżeł	1	1	0
Razem	14	10	4

W czterech obserwowanych przypadkach ustalono, że szczenięta wychowywane były bez matki, bądź też z uwagi na niewystarczającą ilość pokarmu dokarmiane sztucznie. Stwierdzoną w wywiadach cechą wspólną dla prawie wszystkich rozpoznanych przypadków było występowanie pozornie niczym nie uzasadnionych okresowych zaburzeń trawiennych oraz stosowanie dość często w jednostronnym żywieniu dużych ilości surowego bądź gotowanego mleka oraz jego przetworów. Powyższe zaburzenia następowały (bądź nasilały się) zazwyczaj po spożyciu mleka, a także w dwóch przypadkach podobne efekty wywoływało podanie wołowiwy. Inne interesujące dane to jednoczesne występowanie z zaburzeniami trawiennymi swędzących zmian skórnych o cechach wyprysku

Tab. 2. Ustalony wywiadem oraz badaniem klinicznym objawy towarzyszące nietolerancji mleka przez psy

Rasa	Liczba zwierząt	Alergia w rodz.	Apetyt zmienny		Ziewanie		Napady bólowe		Wzdęcia		Biegunki i zaparcia		Biegaczka		Alergicz. zapalenie skóry		Pokrzywka		Obrzęk błony śluzowej		Śluz i kromerki w kale	
			+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-
			Owczarek niem.	5	0	4	1	3	2	2	3	4	1	3	2	2	3	0	5	0	5	3
Mieszaniec	4	0	2	2	2	2	3	1	1	3	4	0	0	4	2	1	3	0	4	2	2	
Terier	3	3	3	0	3	0	2	1	1	2	2	1	1	2	3	0	0	3	0	3	0	
Pudiel	1	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	
Wyżeł	1	1	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	1	
Razem	14	5	10	4	8	6	8	6	6	8	11	3	3	11	8	6	2	12	1	13	10	4

(osiem przypadków), obrzęku naczyniowo ruchowego (jeden) oraz pokrzywki (dwa). U kilku z tych ostatnich ustalono alergiczne obciążenie rodzinne (epizody alergiczne u matek bądź rodzeństwa).

W badaniach klinicznych ustalono (tab. 2, że wspomniane zaburzenia trawienne to przede wszystkim okresowo pojawiający się *fetor ex ore*, zaburzenia w łaknieniu (apetyt zmienny), przewlekłe wzdęcia, nawrotowe ziewanie, niekiedy napady kolkowe oraz naprężeniowe biegunki i zaparcia z reguły bez wzrostu ciepłoty wewnętrznej ciała. Zmiany te zazwyczaj przebiegały podostro bądź przewlekłe, doprowadzając w konsekwencji po upływie pewnego czasu do powstania w pięciu obserwowanych przypadkach chronicznego niezłytu przewodu pokarmowego. Na podstawie zgromadzonych danych klinicznych w obserwowanych przypadkach oraz jedynie doraźnej skuteczności stosowanej zazwyczaj terapii można było przypuszczać, iż całość prezentowanych zmian może mieć charakter alergii pokarmowej.

Badania dodatkowe. Rozpoznanie właściwe mogło być jednak postawione jedynie w oparciu o wybrane testy pomocnicze, znajdujące szerokie zastosowanie w tego typu postępowaniu w medycynie ludzkiej (19—20) i dopiero od niedawna stosowane u psów (4). Użycie ich w badaniach własnych umożliwiło z jednej strony wykazanie istnienia w obserwowanych przypadkach alergizacji wobec składowych mleka, z drugiej zaś, pozwoliło na wypowiedzenie się odnośnie ich przydatności diagnostycznej u psów (tab. 3).

też wyniki (poza dwoma przypadkami) pokrywały się całkowicie z otrzymanymi poprzednio. W trakcie wykonywania tej drugiej ekspozycji u wszystkich zwierząt wykonywano tzw. test Coca (8) oraz oznaczono indeks leukocytny wg Vaughana (26). Zasada próby Coca polega na stwierdzeniu istotnego (co najmniej 20 razy na min.) przyspieszenia tętna po spożyciu domniemanego alergenu. W badaniach własnych oznaczano dwukrotnie ilość tętna (w spoczynku) bezpośrednio przed podaniem mleka oraz w 30 i 60 min. od momentu jego podania. Wyniki tych obserwacji zostały uznane za dodatnie w 9 przypadkach, co stanowi 64,2%. Istota indeksu leukocytnego polega na obserwacji spadku liczby leukocytów obwodowych (co najmniej o 2 do 3 tysięcy) w następstwie spożycia uczulającego pokarmu. Wzrost ich liczby natomiast (tzw. pokarmowa leukocytoza fizjologiczna) przemawia przeciwko uczuleniu. Dwa pierwsze oznaczenia liczby leukocytów wykonano (w odstępach 30-to min.) przed podaniem mleka, pozostałe zaś trzy po 60, 90 i 120 min. od momentu podania. W badaniu tym rezultaty dodatnie uzyskano w 12 przypadkach, co stanowi 85,7% całości.

Poza opisanymi badaniami u wszystkich psów sprawdzono tzw. reaktywność skórną wobec mleka poprzez wykonanie testów śródskórnych. Próby skórne wykonywane były wobec wybranych alergenów pokarmowych przygotowanych systemem pracowniowym, bądź (w pewnej części przypadków) wchodzących w skład zestawów produkcji Stallergenes — Francja i VEB Sachsisches Serumwerk — NRD. Technika i interpretacja wykonywanych testów dokony-

Tab. 3. Wyniki badań dodatkowych u nadwrażliwych wobec alergenów mleka psów

Raza	Liczba zwierząt	Próba prowokacyjna						Ekspozycja wg Rinkela	Test Coca	Indeks Leukocytny	Testy skórne						Odczyn P-K (mod. tram)				
		mleko surowe		mleko gotow.		wołow. surowa					mleko surowe		mleko gotow.		glob. wołowa		+	-			
		+	-	+	-	+	-				+	-	+	-	+	-					
Owczarek niem.	5	2	3	0	1	0	1	3	2	3	2	5	0	1	4	0	5	0	5	1	4
Mieszaniec	4	1	3	1	0	0	1	1	3	3	1	4	0	2	2	0	4	0	4	3	1
Tarlar	3	3	0	2	1	2	1	3	0	2	1	2	1	3	0	2	1	2	1	2	1
Pudel	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	1
Wyżeł	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	0	1	0	1	0	0	1	0	1	1	0
Razem	14	8	6	4	2	3	3	8	6	9	5	12	2	7	7	3	11	3	11	7	7

W pierwszej kolejności u podejrzanych zwierząt wykonywana była tzw. próba wymuszonej ekspozycji na domniemany alergen, zwana także próbą prowokacyjną. Polegała ona na 48 godz. głodzeniu zwierząt (woda do woli) wraz z jednoczesnym obserwowaniem dotychczasowo prezentowanych zmian. Przyjmuje się, że ich ustąpienie (całkowite bądź częściowe) w tym okresie przemawia za alergizacją pokarmową. W naszym przypadku zaobserwowano je u 10 spośród 14 testowanych psów, co stanowi 71,4%. Po upływie dwudniowej głodówki wszystkim testowanym psom podawano (w zależności od wagi ciała) od 300 do 1000 ml świeżego surowego mleka. Postępowanie to spowodowało, że u 8 zwierząt zanikłe całkowicie lub częściowo objawy nawróciły i to niejednokrotnie w dość intensywnej formie (57,2%). Były to trzy foksteriery, dwa owczarki, jeden pudel, wyżeł i mieszaniec, u których odnowiły się przegaste zmiany skórne, pojawił się świąd, a przede wszystkim wystąpiły mniej lub bardziej wyrażone objawy bólowe, wymioty bądź biegunka. Badanie powyższe powtórzono po upływie pewnego czasu (okresy dość różne dla poszczególnych psów) u 6 z wyżej wymienionych zwierząt, stosując jako prowokację mleko gotowane oraz wołową surową. Otrzymano odpowiednio cztery i trzy reakcje dodatnie. U wszystkich z badanych psów stosowano także ekspozycję wykonywaną wg met. Rinkela (17). Polegała ona na całkowitej eliminacji z pożywienia mleka i jego pochodnych przez okres czterech dni, piętego zaś na podaniu go sondą w tych samych (300 do 1000 ml) jak poprzednio ilościach. Otrzymane tą me-

wana była w oparciu o ogólnie przyjęte i powszechnie stosowane zasady (19, 20). Pozytywizacja reakcji skórnych wobec surowego mleka wystąpiła w 7, gotowanego 3 oraz gammaglobuliny bydłowej w 2 przypadkach. Chcąc przekonać się czy u testowanych zwierząt w przebiegu nietolerancji mleka dochodzi do rozwoju przeciwciał typu reaginowego, wykonano z ich surowicami odczyn Prausnitz-Kustnera w modyfikacji trawiennej (25). Do tego celu posłużono się psami-biorcami, którym wprowadzono śródskórnie po 0,2 ml dwukrotnie zagęszczonych surowic pochodzących od testowanych zwierząt. Po upływie 24 godz. (ślady po wprowadzeniu surowic całkowicie zanikły) biorcy otrzymali mleko surowe w ilości zależnej od wagi ciała. Dodatkowo reakcje zaobserwowano w 7 przypadkach, co stanowi 50% całości.

Omówienie przeprowadzonych obserwacji

W diagnozowaniu stanów alergicznych (tak u ludzi jak i u zwierząt) wiadomo, że dla udokumentowania w sposób obiektywny istnienia alergizacji konieczne jest wykrycie obecności swoistego alergenu, jak i skierowanego przeciwko niemu przeciwciała. W praktyce jednak, zwłaszcza w odniesieniu do rozpoznawania alergii pokarmowej, wykonanie tego w

sposób bezpośredni nie zawsze jest możliwy, stąd też konieczność uciekania się do postępowania kompleksowego, obejmującego obserwacje kliniczne, metody swoiste, a także w niektórych przypadkach próby typu nieswoistego. Z dokonanych na naszym materiale obserwacji klinicznych należy podkreślić fakt jednoczesnego występowania u chorych zwierząt szeregu różnych objawów chorobowych, często zupełnie nie związanych z układem trawiennym — czyli obecność kilku chorób jednocześnie. Zjawisko takie jest typowe dla pewnych grup schorzeń uczuleniowych u ludzi i stanowi jedną z charakterystycznych cech atopii (16, 19, 20). Ponadto aktualnie powszechnie przyjmuje się, że alergii pokarmowa nie jest jednoznaczna z alergicznym schorzeniem przewodu pokarmowego, bowiem alergeny pokarmowe mogą wywoływać objawy chorobowe ze strony różnych narządów (7, 16, 18—20). Tym niemniej w dużej liczbie przypadków właśnie one są odpowiedzialne za zaburzenia związane z układem trawienia. Nie wyklucza to jednak faktu iż mogą je powodować i inne alergeny, jakimi są np. tak typowe alergeny wziewne jak pyłki (19, 20).

W świetle powyższego wydaje się, iż poczynione obserwacje odnośnie wielopostaciowości objawów klinicznych nietolerancji mleka przez psy odpowiadają faktom obserwowanym w podobnego typu stanach u ludzi i tym samym sugerują dla szeregu obserwowanych przypadków atopowe podłoże choroby. Dodatkowym, przemawiającym za słusznością tego domniemania, jest fakt wielowartościowości uczulenia — pewne psy bowiem poza nietolerancją mleka wykazywały także jednoczesne występowanie uczulenia wobec innych alergenów pokarmowych (mięso drobiowe, jaja, ryby), wziewnych (pleśnie, pióra, kurz domowy) oraz pcheł. Wydaje się, że poza wrodzoną skłonnością, czynnikiem dodatkowym mogącym mieć pewien wpływ na rozwój nietolerancji było ustalenie (za pomocą wywiadu i badań koproskopowych) styczności z pasożytami żołądkowo-jelitowymi. Aktualnie jej istnienie wykazano u 6 zwierząt, pozostałe zaś przebyły ją co najmniej raz, bądź wielokrotnie. Wiadomo, że tego typu inwazje poprzez swe bezpośrednie bądź pośrednie oddziaływanie prowadzą do wielu zaburzeń pokarmowych i mogą mieć istotny wpływ na proces trawienia i wchłaniania np. białek pokarmowych (mięsa, mleka, jaja). Jest to niewątpliwie bardzo istotne z punktu widzenia rozwoju ich nietolerancji. Ponadto godnym podkreślenia wydaje się spostrzeżenie wystąpienia alergizacji wobec mleka u zwierząt wychowywanych bez matki, zbyt wcześnie odsadzonych, bądź też od chwili urodzenia dokarmianych sztucznie, a to z uwagi na niewystarczającą ilość naturalnego pokarmu. W obserwacjach własnych tego typu psy stanowiły 50% ogółu (7 zwierząt) obserwowanych przypadków. Spostrzeżenie to

można by odnieść do faktu częstszego występowania nietolerancji wobec mleka u dzieci karmionych od chwili urodzenia sztucznie i rzadszego jej występowania w przypadku długotrwałego stosowania pokarmu matki (7, 15, 16, 18—20). Rozpatrując nietolerancję mleka w aspekcie uczulenia wobec poszczególnych jego składowych, u badanych psów możliwe było (z przyczyn natury obiektywnej) ustalenie tego jedynie u 6 testowanych zwierząt. Uwaga ta dotyczy tych psów, u których możliwe było wykonanie prowokacji ponawianych wobec mleka gotowanego oraz surowej wołowiny. I tak nietolerancję wobec laktoglobuliny wykazano w 4 przypadkach. Były to psy (2 teriery, 1 pudel oraz mieszaniec) reagujące dodatnio w próbach prowokacyjnych z mlekiem surowym, gotowanym oraz wołowiną, dające ponadto dodatnie reakcje skórne wobec mleka surowego, gotowanego oraz gammaglobuliny bydlęcej. Interesujące jest, że właśnie u dwóch spośród nich (terier i pudel) już w wywiadzie wskazywano poza mlekiem na mięso wołowe jako domniemaną przyczynę występowania zaburzeń. O nietolerancji wobec laktoalbuminy bądź kazeiny można mówić u dwóch spośród sześciu trzykrotnie testowanych zwierząt. Były to psy (terier i owczarek niemiecki) reagujące dodatnio z mlekiem surowym, a pozostające areaktywne wobec mleka gotowanego i wołowiny.

Starając się ocenić wiarygodność i przydatność w testowaniu u psów zastosowanych metod, wydaje się, że za najbardziej wartościowe należy uznać próby prowokacyjne, a dopiero w dalszej kolejności modyfikację trawinną odczynu P-K oraz próby skórne. Ocena ta pokrywa się z opiniami prezentowanymi przez Waltona i Bakera (3, 23, 24). Spośród prób nieswoistych wiele przydatnym jest indeks leukocytarny, próbę Coca bowiem z uwagi na możliwość wpływu na uzyskany wynik szeregu czynników ubocznych (np. zmienność stanów emocjonalnych) należy uznać za niezbyt przekonującą. Oceniając całkoształt zastosowanego postępowania wydaje się, że jest ono realnym w wykonaniu i w miarę prostym oraz w pełni wystarczającym sposobem osiągnięcia podstawowego celu, jakim jest rozpoznanie alergii pokarmowej u psów.

Piśmiennictwo

1. Alterauge W.: Vet. Med. Leipzig 25, 734, 1958.
2. Bahna S. L., Heiner D. C.: ADV Pediatr. 25, 1, 1978.
3. Baker K. P.: J. small Anim. Pract. 12, 445, 1971.
4. Baker E.: Vet. Clin. North Am. 4, 1974.
5. Bleumink E., Berrens L.: Nature, Lond. 212, 541, 1966.
6. Bleumink E., Young E.: Int. Archs. Allergy 34, 521, 1968.
7. Chachaj W.: Klinika chorób alergicznych. PZWL, 1975.
8. Gay L. P.: Test procedures used in the examination of the allergic patients. ed. Stanford-Kroese, Leiden 1961.
9. Gavant U. D., Hyde J. S., Moore B. S.: Ann. Allergy 40, 314, 1978.
10. Goldman A. S., Anderson D. W., Sellers W. A., Saperstein S., Knikoer W. T., Halpern S. R.: Pediatrics 32, 425, 1963.
11. Goldman A. S., Sellers W. A., Halpern S. R., Anderson D. W., Furlow T. E., Johnson C. H.: Pediatrics 32, 572, 1963.
12. Hansen K.: Allergie. D. Thieme. Stuttgart 1957.
13. Hansen L. A.: Acta Pediatr. Uppsala 50, 484, 1961.
14. Jennings A. R.: Animal pathology Bailliere Tindall-Cassell, Lond., 1970.

15. Kemona Z.: *Peł. pol.* 48, 12, 1973.
16. *Obtulowicz M.*: Zarys alergologii. AM Kraków, 1971.
17. *Rinkel H. J.*: Food allergy. Thomas, Springfield, 1951.
18. *Romański B.*: Alergologia dla internistów. PZWL, 1976.
19. *Rudzki E.*: Podstawy alergologii klinicznej. PZWL, 1970.
20. *Stanworth D. R.*: Immediate hypersensitivity. Am. Elsevier Comp. N. Y., 1973.
21. *Stintzing G., Zetterstr R.*: Acta Paediatr. Uppsala 68, 333, 1979.
22. *Urbach E.*: Klinik und Therapie der allergischen Krankheiten. W. Maudrich, Wien 1935.
23. *Walton G. S.*: Vet. Rec. 67, 709, 1967.
24. *Walton G. S.*: Vet. Rec. 83, 35, 1968.
25. *Walzer M.*: J. Immun. 17, 143, 1929.
26. *Waughan W. T., Black J. H.*: Practice of allergy. Kimpton, Lond., 1948.

Adres autora: dr Zbigniew Pomorski, Al. Kraśnicka 89/2, 20-718 Lublin.

JÓZEF FILAR, ELIGIUSZ MADEJ, STANISŁAW DACKA

Prosta metoda oznaczania związków ketonowych i ich poziom we krwi krów zdrowych i z subkliniką ketozą

Z Kliniki Chorób Wewnętrznych Instytutu Chorób Niezakaźnych Wydziału Weterynaryjnego
AR w Lublinie
Z Instytutu Chemii UMCS w Lublinie

Wraz ze wzrostem zainteresowania w Polsce badaniami nad ketozą u krów oraz opracowaniem programów kontroli zdrowia dla stad krów mlecznych, powstało zapotrzebowanie na dokładne, a równocześnie proste metody (nadające się do badań masowych) oznaczania związków ketonowych (Zw. K.) w krwi (1, 4, 6, 11).

Ogólnie znane trudności w oznaczaniu całkowitej ilości Zw. K. (acetonu, acetoctanu i B-hydroksymaślanu) w postaci acetonu za pomocą metod chemicznych sprawiają, że ciągle opracowywane są nowe metody, bądź ich modyfikacje, zmierzające do zwiększenia dokładności oraz uproszczenia techniki oznaczania (2, 7, 14, 15). Mała dokładność niektórych metod wynika między innymi z niepełnej konwersji B-hydroksymaślanu do acetonu (2), co ma szczególne znaczenie przy oznaczaniu Zw. K. u krów, gdyż B-hydroksymaślan jest głównym związkiem ketonowym (stanowi około 85% sumy związków ketonowych) w krwi tych zwierząt (1).

Trudności techniczne ograniczające zastosowanie niektórych metod do badań masowych polegają głównie na konieczności przeprowadzenia acetoctanu i B-hydroksymaślanu w aceton oraz czasochłonnym oddestylowaniu lub oddestylowaniu go w naczyniach mikrodyfuzyjnych lub Convaya. Wad tych pozbawione są metody enzymatyczne (1).

Trudności związane z importem enzymu, dehydrogenazy kwasu B-hydroksymasłowego, ograniczają jak dotychczas szersze ich wprowadzenie w Polsce.

Celem badań było:

— adaptacja i ocena metody zaproponowanej w 1970 r. przez Göschke, w której wyeliminowano destylację oraz dyfuzję acetonu,

— określenie za pomocą tej metody zawartości Zw. K. we krwi u krów zdrowych i z subkliniką ketozą.

Materiał i metody

Zasada metody. Metoda służy do oznaczenia sumy związków ketonowych (acetonu, acetoctanu i B-hydroksymaślanu) w postaci acetonu. Zasada metody polega na przeprowadzeniu acetoctanu i B-hydroksymaślanu w obecności kwasu siarkowego i dwuchromianu potasu w temp. 110° i 140° C w aceton i jego barwnej reakcji z 2,4-dwunitrofenylohydrazyną.

Odczynniki. Wszystkie odczynniki winny być dużej czystości (cz.d.a.).

1. Wodorotlenek baru (Ba(OH)₂) — 0,1 M
2. Siarczan cynku (Zn SO₄ · 7 H₂O) — 3,5%
3. Kwas siarkowy (H₂SO₄) — 6 M
4. Dwuchromian potasu (K₂Cr₂O₇) — 0,35%
5. Siarczan sodu (Na₂SO₃) — 5%
6. Chlorowodorek 2,4 — dwunitrofenylohydrazyny
7. Odczynnik wywołujący barwę. 0,2 g chlorowodoru 2,4 — dwunitrofenylohydrazyny rozpuścić w 100 ml 5 M kwasu siarkowego, a następnie wytrząsać 3-krotnie z czterochlorkiem węgla.
8. Czterochlorek węgla
9. Wodorotlenek sodu (NaOH) — 0,25 M
10. Aceton. Macierzysty roztwór wzorcowy acetonu oraz wzorcowe roztwory robocze przygotowane wg ogólnie przyjętych zasad w analityce laboratoryjnej. Dokładne stężenie acetonu w macierzystym roztworze należy określić metodą jodometryczną (14). Podstawowy sprzęt laboratoryjny. Probówki z korkiem na szlif o wysokości 22 cm i średnicy 1,5 cm, łaźnia olejowa z termoregulacją, wytrząsarką, pompa wodna, fotometr (Specol).

Postępowanie analityczne. Krew pobrać do probówek z heparyną. Bezpośrednio po pobraniu włożyć probówkę do termosu z lodem (zapobiega to spontanicznej dekarboksylacji acetoctanu do acetonu i jego stratom) i tak transportować.

Odbiałczanie. Do probówek wirówkowych (z korkiem na szlif) odmierzyć 11 ml bidestylowanej wody oraz 1 ml krwi, wymieszać, po czym dodać 4 ml wodorotlenku baru, a następnie 4 ml siarczanu cynku. Probówki zamknąć korkiem, a zawartość energicznie wymieszać, po czym wirować przez 5 min. przy 3000 obr/min.

Oznaczanie związków ketonowych. Do probówki z korkiem na szlif odmierzyć 2,5 ml supernatantu i dodać 0,5 ml 5 M H₂SO₄, wymieszać. Probówki zamknąć korkami posmarowanymi smarem Silikon i ogrzewać w łaźni olejowej w temp. 110°C przez 10 min (jest to etap dekarboksylacji acetoctanu do acetonu). Po wyjęciu z łaźni probówki oziębować w wodzie z lodem, po czym zawartość wymieszać przez kilkakrotnie odwrócenie probówki i dodać 0,5 ml 0,35% dwuchromianu potasu. Probówki zamknąć korkiem, zawartość wymieszać i ogrzewać w temp. 135–140°C przez 45 min (jest to etap utleniania B-hydroksymaślanu do acetonu). Po wyjęciu z łaźni probówki oziębować w wodzie z lodem, wymieszać, dodać 0,5 ml 5% siarczanu sodowego, 0,5 ml roztworu 2,4 — dwunitrofenylohydrazyny i 5 ml czterochlorku węgla. Umieścić probówki w wytrząsarce i wytrząsać przez 30 min., aby powstały 2,4-dwunitrofenylohydrazon przeszedł do czterochlorku węgla. Po oddzieleniu się