

ELŻBIETA M. HEYDRYCH, WINCENTY WIĘCKOWSKI

Czas i warunki termiczne przechowywania próbek krwi a wartości parametrów równowagi kwasowo-zasadowej u krów

Zakład Ekologii Produkcji Zwierzęcej Instytutu Weterynarii, Oddział w Poznaniu,
ul. Grunwaldzka 250, 60-166 Poznań

Summary

Time and thermic conditions of blood samples storage and the values of acid-basic balance in cows

The influence of time in the storage of blood samples at from 0°C to 5°C on the parameters of acid-basic balance, i.e. pH, pCO₂ and act·HCO₃⁻ in the blood of 47 samples, collected at random from cows, was assessed. The determinations of pH and pCO₂ were done twice. First after 3 hour transportation in a cool box and later after 21 hour storage in a refrigerator at 5°C. No statistically significant differences were found. The findings indicate that under proper conditions the above parameters can be performed up to 24 hours since the collection of blood samples.

W diagnostyce weterynaryjnej pomiar równowagi kwasowo-zasadowej (rkz) przeważnie nie jest wykonywany bezpośrednio w terenie, a dokonuje się go po przewiezieniu próbek do laboratorium. Temperatura otoczenia, w jakim przebywają próbki krwi podczas transportu i czas upływający od momentu ich pobrania do wykonania oznaczeń mogą być źródłami błędów przedlaboratoryjnych w pomiarach parametrów rkz (1, 3, 6). Pinkiewicz zaleca, w tej sytuacji, przechowywanie próbek w temp. ok. +4°C, nie podając bezpiecznej długości czasu. Zależnością parametrów rkz krwi krów od czasu ich przechowywania zajmowali się Chyla i wsp. (2) oraz Krokavec i wsp. (4). Chyla i wsp. (2) nie stwierdzili różnic statystycznie istotnych między pomiarami wykonywanymi bezpośrednio po pobraniu krwi a pomiarami wykonywanymi po upływie 0,5, 3, 6 i 8 godzinach przechowywania próbek w lodówce w temperaturze +5°C. Natomiast Krokavec i wsp. (4) stwierdzili istnienie statystycznie istotnych zmian w wartościach parametrów rkz w 6 godzinie przebywania próbek w temperaturze od 0 do +4°C. Proponują oni wykonywać pomiary parametrów rkz w czasie do 5 godzin od momentu pobrania próbek krwi.

Celem pracy było określenie możliwości przedłużenia czasu przechowywania próbek krwi w temperaturze nie przekraczającej +5°C bez ujemnego wpływu na wartość trzech podstawowych parametrów rkz tj. pH, prężności dwutlenku węgla (pCO₂) i aktualnego stężenia wodorowęglanów (akt. HCO₃⁻).

Materiał i metody

Badania obejmowały próbki krwi żyłnej pobrane od 47 losowo wybranych krów, które pochodziły z 5 różnych gospodarstw rolnych. Doświadczenie przeprowadzono w miesiącach letnich: czerwiec-sierpień. Krew pobierano z żyły jarzmowej, bez kontaktu z powietrzem, do 2 ml całoszkłanych strzykawek Rekord. Strzykawki były wyposażone w szklane perełki — mieszalniki. Końcówki strzykawek wypełniano 50 µl roztworu heparyny po 25 jednostek i zamknięto metalowymi kapturkami. Próby krwi, po uprzednim zabezpieczeniu końcówek strzykawek metalowymi kapturkami przed dostępem powietrza, mieszano w celu równomiernego rozprowadzenia heparyny w próbce i natychmiast schładzano poprzez umieszczenie ich w torbie chłodniczej pomiędzy dwoma zamrożonymi akumulatorami chłod-

niczymi. W taki sposób zabezpieczone próbki krwi dowożono niezwłocznie do laboratorium. Pomiarów pH i pCO₂ dokonano w pełnej krwi heparynizowanej metodą bezpośrednią przy pomocy mikroelektrod do pomiarów PH i pCO₂, które stanowiły wyposażenie Biologicznego Mikroanalizatora typu OP 210/3 f-my Radelkis — Budapeszt. Stężenie akt. HCO₃⁻ odczytywano z nomogramu „kwas — zasada”, stanowiącego dodatkowe wyposażenie mikroanalizatora. Wartości pH i pCO₂ w próbach krwi mierzono dwukrotnie. Pierwszy raz po 3 godzinach transportu i przechowywania próbek w torbie chłodniczej, a drugi raz w 24 godziny od momentu pobrania i dalszego przechowywania w lodówce w temperaturze +5°C.

Ocenę istotności różnic dwóch wartości średnich z 47 pomiarów dokonano testem t-Studenta dla obserwacji sparowanych. Istotność statystyczną uznawano przy poziomie prawdopodobieństwa 95%.

Wyniki i omówienie

Wartości pH i pCO₂ oraz wyliczonej wartości akt. HCO₃⁻ ilustruje tab. 1. Średnie wartości pH próbek krwi kształtowały się po 3 i po 24 godzinach odpowiednio na poziomach 7,403 ± 0,049 i 7,408 ± 0,040. Średnia różnica wynosiła 0,005. Stwierdzono, że różnice w pomiarach pH nie są istotne statystycznie. Analizując wartość pH krwi poszczególnych krów stwierdzono po 24 godzinach jej wzrost w 24 przypadkach, obniżenia w 18, a brak zmian w 3. Omawiane zmiany pH były bardzo małe i statystycznie nieistotne, co świadczy, że w przyjętych warunkach doświadczalnych nie miał miejsca wzrost kwasowości próbek jako następstwo przemian metabolicznych.

Tab. 1. Wartości parametrów równowagi kwasowo-zasadowej we krwi 47 krów, którą przechowywano w temperaturze nie przekraczającej +5°C

Parametr rkz	Czas przechowywania próbek (godz.)	Rozrzut wartości w badanej grupie zwierząt	$\bar{x} \pm s$
pH	3	7,30—7,49	7,403 ± 0,049
	24	7,35—7,49	7,408 ± 0,040
pCO ₂ (kPa)	3	6,00—9,07	7,41 ± 0,69
	24	6,27—8,80	7,31 ± 0,71
akt. HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	3	25,5—41,5	33,0 ± 5,2
	24	24,0—47,0	32,5 ± 6,0

Średnie wartości pCO₂ próbek krwi kształtowały się po 3 i 24 godzinach na następujących poziomach: 7,41 ± 0,69 i 7,31 ± 0,71 kPa. Średnia różnica dla tego parametru wynosiła 0,10 kPa i była również nieistotna statystycznie. Ogólnie stwierdzono nieznaczne wahania wartości pCO₂. Obniżenie wartości nastąpiło w 25 przypadkach, w 16 podwyższenie, a brak zmian w 5. Podobnie, jak w przypadku pH nie stwierdzono zdecydowanego wzrostu pCO₂ spowodowanego przemianami metabolicznymi *in vitro*.

Średnie wartości akt. HCO₃⁻ po upływie 3 i 24 godzin były na poziomie 33,0 ± 5,2 i 32,5 ± 6,0 mmol/l,

a średnia różnica wynosiła 0,50 mmol/l. Różnice pomiędzy stężeniami akt. HCO_3^- nie były istotne statystycznie.

Przedstawione wyniki dowodzą, że przechowywanie prób krwi w odpowiednich warunkach przez okres 24 godzin nie wywiera ujemnego wpływu na wartości uzyskiwanych wyników. Do warunków tych należy zaliczyć przede wszystkim natychmiastowe schłodzenie zakonserwowanych heparyną prób i ich przetrzymywanie podczas transportu do laboratorium w torbie chłodniczej w temperaturze od 0 do $+4^\circ\text{C}$, a następnie w lodówce w temperaturze $+5^\circ\text{C}$. Stwarza to możliwości wydłużenia czasu przetrzymywania prób krwi w niskiej temperaturze do $+5^\circ\text{C}$ przez okres dłuższy niż zalecali

Chyla i wsp. (2) oraz Krokavec i wsp. (4), bo do 24 godzin.

Piśmiennictwo

1. Banaszyk F.: Teoretyczne podstawy badania równowagi kwasowo-zasadowej krwi dla potrzeb fizjologii wysiłku fizycznego i sportu. Skrypt AWF w Poznaniu, nr 67, 1986.
2. Chyla M., Buďačová D., Šterbaková A.: Vet. Med. (Praž) 32, 181, 1987.
3. Koziołowski A., Orlowska K.: Badania czynnościowe narządu oddechowego, red. Czyżyk A.: Badania czynnościowe w klinice chorób wewnętrznych, PZWL, Warszawa 1969, s. 70.
4. Krokavec M., Šimó K., Martinko A.: Vet. Med. (Praž) 32, 145, 1987.
5. Pinkiewicz E.: Podstawowe badania laboratoryjne w chorobach zwierząt. PWRiL, Warszawa 1971, s. 96.
6. Szafran H., Owsinski J., Szafran Z.: Przegl. lek. 30, 747, 1973.

Adres autora: dr Elżbieta M. Heydrych, Os. Kosmonautów 18 m. 125, 61-641 Poznań

DANUTA CZERNOMYSY-FUROWICZ, ANTONI J. FUROWICZ

Porównanie testu redukcji błękitu nitrotetrazoliowego przez obojętnochłonne granulocyty owcze w metodach cytochemicznej i spektrofotometrycznej*)

Katedra Immunologii i Mikrobiologii Wydziału Zootechnicznego AR,
ul. Doktora Judyma 24, 71-460 Szczecin

Summary

Evaluation of nitroblue tetrazolium reduction by sheep polymorphonuclear neutrophils in cytochemical and spectrophotometric techniques

Reduction of NBT by polymorphonuclear neutrophils was determined by means of two techniques: cytochemical according to Park and spectrophotometrical according to Raman and Poland. Thirty two tests were performed on healthy lambs. A considerable correlation was observed between the results obtained using these two techniques. The authors suggest that spectrophotometric technique is easier, more objective and requires less blood for testing.

Granulocyty obojętnochłonne, określane również jako neutrofile lub komórki PNL (Polymorphonuclear Neutrophil Leukocytes), reprezentują pierwszą linię obrony przeciwzakaznej. Biorąc udział w fagocytozie, pierwsze pojawiają się w miejscu uszkodzenia tkanek (10, 15). W procesie likwidowania drobnoustrojów, dzięki obecności swoistych receptorów, współdziałają z dopełniaczem (C_3e) i immunoglobulinami (Fc) (2, 12). Ważną rolę w ich fagocytarnej stymulacji odgrywają limfokiny: CF (Chemotactic Factor) i LIF (Leukocyte Inhibitory Factor) (14). Obojętnochłonne granulocyty charakteryzują się zdolnością redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT). Fakt ten został wykorzystany w diagnostyce laboratoryjnej do oceny czynności i wykrywania zaburzeń neutrofilii oraz do różnicowania zakażeń wirusowych, bakteryjnych i chorób nowotworowych (6, 8, 9, 18). Wprowadzona przez Parka (8) metoda opiera się na mikroskopowej ocenie odsetka granulocytów zawierających zredukowany barwnik. Za pomocą tej metody określono we wcześniejszych badaniach czynności granulocytów u cieląt chorych na enzootyczną bronchopneumonię, stymulowanych *P. acnes* (t. 2) CN 5936 oraz u owiec z endemiczną formą listeriozy, leczonych tym preparatem. W obu przypadkach odnotowano statystycznie istotny wzrost liczby komórek redukujących NBT (4, 5).

Metoda spektrofotometryczna polega na ekstrahowa-

niu zredukowanego barwnika rozpuszczalnikiem organicznym (dwumetyloformamidem) i pomiarze spektrofotometrycznym (1, 11). Wykazuje ona korelację z metodą cytochemiczną. Jest jednak dokładniejsza i szybsza. Dane te dotyczą jednak badań wykonywanych z granulocytami ludzkimi (3, 6) oraz bydłowymi (13).

Celem badań własnych była ocena testu redukcji błękitu nitrotetrazoliowego przez granulocyty owcze w metodach cytochemicznej i spektrofotometrycznej.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono równolegle 2 metodami (cytochemiczną i spektrofotometryczną) na 32 klinicznie zdrowych jagniętach rasy merynos, będących w wieku 4 tygodni. Oznaczenia wykonano we krwi żyłnej heparynizowanej, używając do tego celu plastikowych probówek.

Metoda cytochemiczna wg Parka (8). Do 0,1 ml krwi dodawano 0,1 ml 0,2% roztworu NBT. Tak przygotowaną próbę inkubowano w 37°C przez 30 min. Następnie sporządzono rozmazy utrwalane alkoholem metylowym i barwione przez 10 min. barwnikiem o następującym składzie: zieleń metylowa — 0,015 g, pyromina — 0,25 g, fenol krystaliczny — 0,5 g, alkohol etylowy — 0,5 ml, woda destylowana — 100 ml.

Granulocyty uważano za NBT dodatni, o ile wielkość złożeń przewyższała ziarnistość granulocytów obojętnochłonnych. Ustalono procent komórek formazanowych, licząc w mikroskopie świetlnym co najmniej 200 granulocytów.

Metoda spektrofotometryczna wg Ramana i Polanda (11). Do 0,2 ml 0,1% roztworu NBT dodawano 0,2 ml pełnej krwi żyłnej. Próbę inkubowano w cieplarni o temp. 37°C przez 30 min., a następnie przez dalsze 30 min. w temp. pokojowej (20°C). Równolegle z próbą badaną wykonywano próbę kontrolną („zerową”), dodając zamiast roztworu NBT, bufor fosforanowy o $\text{PH} = 6,8$. Po inkubacji, do plastikowej probówki przenoszono po 0,05 ml mieszaniny krwi i barwnika i ekstrahowano w 1 ml NN-limetyloformamidu (DMF). Analogiczne czynności wykonywano z próbami kontrolnymi. Następnie obie próby odwirowywano (2000 obr./min przez 10 min.) i mierzono gęstość optyczną wobec DMF przy długości fali 600 nm. Równolegle oznaczano ogólną ilość leukocytów oraz wykonywano leukogram.

Wyniki i omówienie

Wartość gęstości optycznej poszczególnych prób przeliczano na 10 000 granulocytów obojętnochłon-

* Badania wykonano w programie CPBP 05.06.4.