

ELŻBIETA KURSKA, KRYSZYŃA WITCZAK

Oznaczenie porównawcze aminotransferaz w surowicy metodą Reitmana-Frankela i przy pomocy testu Fermognost

Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej Wydziału Weterynarii WSR w Olsztynie
Kierownik: doc. dr Z. MARKIEWICZOWA

Oznaczanie aktywności enzymów krwi obwodowej zwierząt jest jednym z ważnych wskaźników biochemicznych pomocnych, w połączeniu z badaniami klinicznymi, w rozpoznawaniu procesów chorobowych. Największe znaczenie posiadają enzymy biorące udział w podstawowej przemianie materii, a spośród nich jedno z pierwszych miejsc zajmują aminotransferazy. Należą one do drugiej klasy enzymów — transferaz-katalizujących przenoszenie z donatora na akceptor różnorodnych grup takich jak aminowa, acylowa, glikozyłowa i inne. Aminotransferazy (AspAT czyli GOT, AlAT czyli GPT) przenoszą w sposób odwracalny grupę NH_2 z aminokwasów na ketokwasy, w wyniku czego pierwotny aminokwas staje się ketokwasem, a wchodzący w reakcję ketokwas aminokwasem. Grupą czynną aminotransferaz jest fosforan pirydoksalu.

Procesy transaminacji stwierdza się prawie we wszystkich narządach i tkankach zwierzęcych. Najbogatsze w transaminazy są: wątroba, mięsień sercowy, nerki i mięśnie szkieletowe. Enzymy te znajdują się głównie w cytoplazmie komórek, a w przypadku ich uszkodzenia, łatwo przenikają do płynu tkankowego i krwi gdzie obserwuje się wzrost ich aktywności. Czynność aminotransferaz w surowicy wzrasta w chorobach przebiegających z uszkodzeniem lub martwicą tkanek, głównie zaś wątroby i mięśnia sercowego. Oznaczanie tych enzymów w surowicy zwierząt znalazło największe zastosowanie jako jedna z prób czynnościowych wątroby świadcząca o stopniu uszkodzenia tego narządu (4, 5).

Niektórzy autorzy zwracają jednak uwagę na fakt, że zmiany w aktywności enzymów surowicy nie zawsze muszą mieć związek ze schorzeniami narządowymi, mogą się wiązać również z niekorzystnymi wpływami czynników zewnętrznych. Neuman i Maderova (6) donoszą, że u głodującego bydła poziom aminotransferaz wzrasta półtorakrotnie, a głodujących koni nawet dwukrotnie. Cornelius i wsp. (3) stwierdzili znaczny wzrost aktywności AspAT i AlAT w surowicy koni podczas wzmózonego wysiłku, natomiast Chwojnowski i Kluczek (2) notowali podwyższenie tych enzymów w surowicy transportowych owiec, szczególnie u osobników którym podano trankwilinę.

Z uwagi na coraz szersze stosowanie w diagnostyce klinicznej badań biochemicznych, a w tym i aktywności enzymów oraz jednocześnie dokonywanie oznaczeń u dużej liczby zwie-

rząt, zachodzi konieczność wprowadzenia metod laboratoryjnych pozwalających na możliwie dokładne i szybkie ich wykonanie. Zastosowanie tzw. suchych testów diagnostycznych w pracy laboratoryjnej pozwala na całkowite pominięcie lub skrócenie czasu przygotowania odczynników, a również skraca czas właściwych oznaczeń biochemicznych.

Celem niniejszej pracy była ocena aktywności aminotransferaz oznaczonych metodą rutynową Reitmana-Frankela i przy pomocy testu Fermognost w surowicy krów i koni oraz przydatności próby testowej w praktyce laboratoryjnej.

Materiał i metody

Badania przeprowadzono u 30 krów rasy ncb i 30 koni wszechstronnie użytkowych nie wykazujących objawów chorobowych. Oznaczania aktywności aminotransferaz asparaginianowej i alaninowej wykonywano równoległe dwoma metodami: powszechnie stosowaną metodą kolorymetryczną wg Reitmana-Frankela (7) oraz przy użyciu testów Fermognost GOT-test i GPT-test.



Ryc. 1.

Obydwa testy GOT-test i GPT-test firmy Veb Arzneimittelwerke Dresden, DDR (ryc. 1) zawierają po trzy buteleczki ze sproszkowanymi odczynnikami i dokładną instrukcją. Metoda oznaczeń oparta jest na metodzie Reitman-Frankela, a jedno opakowanie przewidziane do wykonania 50 prób. Zgodnie z instrukcją suche odczynniki należy rozpuścić w odpowiedniej ilości wody redestylowanej, a odczynnik barwiący również w kilku ml kwasu solnego. Do zestawu przygotować należy dodatkowo jedynie 500 ml 0,4 n ługu sodowego.

Krew do badań pobierano u krów i koni z żyły jarczmovej, po odwirowaniu surowicę przechowywano w temp. $+4^{\circ}\text{C}$ w czasie do dwóch dni. Oznaczenia w obu metodach wykonywano przy pomocy spektrofotometru „Specol” przy użyciu filtra o długości fali 505 m μ przy oznaczaniu metodą rutynową i 546 m μ przy oznaczaniu testem.

Wynik badań oparto na rachunku statystycznym, podając średnią arytmetyczną, odchylenie standardowe średniej arytmetycznej i pojedynczego wyniku, przedział ufności wg Studenta i liczbę t Studenta.

Wyniki i omówienie

Badania aktywności aminotransferaz asparaginianowej i alaninowej w surowicy krów i koni wykonywane były w poszczególnych próbkach jednocześnie obydwoma metodami w celu zachowania jednakowych warunków badań.

Wśród 30 oznaczeń aktywności AspAT przeprowadzonych w surowicy krów 12 było wyników jednoznacznych, 18 wykazało różnice od 0,5 do 6,0 jedn. enz., zaś jednoznacznych oznaczeń aktywności AlAT wykazano 10, a różnice od 0,5 do 3,0 jedn. enz. stwierdzono w 20 próbkach. W surowicy 30 badanych koni zgodne wyniki aktywności AspAT otrzymano w 6 próbkach, a rozbieżności wyników od 0,5 do 14,0 jedn. enz. stwierdzono u 24 sztuk; dla oznaczeń AlAT uzyskano 11 wyników jednoznacznych, a różnice w granicach od 0,5 do 5,0 jedn. enz. w 19 próbkach.

Średnia arytmetyczna wyników oznaczania metodą Reitmana-Frankela wynosiła dla

transferazy alaninowej odpowiednio u krów 3,00 i 3,30, a u koni 2,74 i 2,30. Odchylenie to wykazało więc znowu największe różnice pomiędzy oznaczeniami AspAT surowicy koni.

Obliczeniem przedziału ufności wg Studenta stwierdzono również niewielkie różnice pomiędzy wynikami uzyskanymi przy zastosowaniu obydwu metod oznaczenia aktywności enzymów, jedynie największą różnicę otrzymano dla AspAT u koni.

Na podstawie obliczeń statystycznych uznano brak istotnych różnic pomiędzy dwoma seriami aktywności aminotransferaz w surowicy krów i koni oznaczonych różnymi metodami. Potwierdza to eksperymentalna liczba *t* Studenta, która we wszystkich badaniach jest niższa od wartości teoretycznej *t*-alfa odczytanej z tabeli rozkładu przy odpowiednim poziomie ufności i liczbie stopnia swobody.

Otrzymane wyniki badań przedstawiono w tab. 1.

Tab. 1. Wyniki oznaczeń aktywności transaminaz w surowicy krów i koni

Rodzaj obliczenia	K r o w y				K o n i e			
	AspAT		AlAT		AspAT		AlAT	
	test	Reitman-Frankel	test	Reitman-Frankel	test	Reitman-Frankel	test	Reitman-Frankel
Średnia arytmetyczna w jedn. enzymatycznych	32,55	31,11	7,90	6,30	91,50	78,30	7,30	6,60
Odchylenie standardowe średniej arytmetycznej	1,09	0,90	0,58	0,52	5,55	3,28	0,44	0,46
Odchylenie standardowe pojedynczego wyniku	6,00	4,97	3,30	3,00	28,32	16,77	2,60	2,74
Przedział ufności wg Studenta	32,55 ± 1,09	31,11 ± 0,90	7,90 ± 0,58	6,30 ± 0,52	91,50 ± 5,55	78,30 ± 3,28	7,30 ± 0,44	6,60 ± 0,46
Liczba <i>t</i> Studenta	1,01		2,03		2,11		1,06	

AspAT w surowicy krów 31,11 jedn. enz., a w surowicy koni 78,30 jedn. enz., zaś dla AlAT — w surowicy krów 6,30 jedn. enz. a u koni 6,60 jedn. enz. Aktywność tych enzymów oznaczana przy pomocy GOT-test i GPT-test wynosiła dla AspAT w surowicy krów 32,55 jedn. enz., w surowicy koni 91,50 jedn. enz., zaś dla AlAT odpowiednio 7,90 i 7,30 jedn. enz.

Odchylenie standardowe średniej arytmetycznej wynosi dla oznaczeń AspAT u krów metodą Reitmana-Frankela 1,09, przy użyciu GOT-test 0,90, a u koni 3,28 i 5,55. W oznaczeniu aktywności AlAT w surowicy krów metodą Reitmana-Frankela odchylenie standardowe wynosiło 0,58 i metodą GPT-test 0,52, zaś w surowicy koni odpowiednio 0,44 i 0,46. Największe więc odchylenie uzyskano w oznaczeniach aktywności AspAT u koni przy pomocy testu.

Odchylenie standardowe pojedynczego wyniku w surowicy krów w zakresie aktywności aminotransferazy asparaginianowej obydwoma metodami wynosiło 4,97 i 6,00 zaś w surowicy koni 16,77 i 28,32. W zakresie oznaczeń amino-

Zaobserwowano, że wraz ze wzrostem aktywności aminotransferaz w badanej surowicy zwiększają się rozbieżności w wynikach badań. W surowicy koni, wykazującej znacznie wyższą aktywność aminotransferazy asparaginianowej różnica pomiędzy średnimi arytmetycznymi w obydwu seriach oznaczeń wynosiła około 14%. Odchylenia te jednak mieszczą się w granicach błędów statystycznego. Podobne wyniki otrzymali w swoich badaniach Adamkowski i Rychlik (1). Autorzy ci oznaczali aktywność aminotransferaz przy użyciu UV-Test — FERMognost surowicy ludzi, wykazując zgodność wyników z metodą rutynową w surowicy o niskim poziomie enzymów, jednak wraz ze wzrostem ich aktywności różnice oznaczeń sięgały 20%.

Stosowana w przeprowadzonych badaniach aktywności aminotransferaz metoda Reitmana-Frankela jak i metoda z użyciem testów FERMognost jest metodą kolorymetryczną, zgodnie jednak z załączoną do testu instrukcją, czas wykonania oznaczeń jest krótszy o 10

minut. Główną jednakże zaletą użycia gotowych zestawów testowych jest łatwość przygotowania odczynników. Rozpuszczanie odpowiednich ilości substancji w wodzie redestylowanej łącznie z przygotowaniem potrzebnego roztworu ługu sodowego trwa około 15 minut, podczas gdy przygotowanie tych samych odczynników w odpowiednich roztworach dla metody Reitmana-Frankela wymaga około 2—3 godziny pracy. Zaznaczyć również należy, że zakupienie niektórych odczynników wchodzących w skład zestawu może nastęrczać pewne trudności.

Wnioski

1. Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono brak istotnych różnic w wynikach oznaczenia aktywności transaminaz AspAT i AlAT surowicy krów i koni metodą Reitmana-Frankela i przy użyciu testów Fermognost.

2. W surowicy o wyższej aktywności aminotransferazy AspAT u koni wzrastają różnice w wynikach aktywności enzymów oznaczanych różnymi metodami, odchylenia te mieszczą się jednak w granicach błędu statystycznego.

3. Użycie GOT-test i GPT-test Fermognost do oznaczeń aktywności aminotransferaz jest przydatne i ułatwia wykonanie tych badań w praktyce laboratoryjnej.

Piśmiennictwo

1. Adamkowski K., Rychlik G.: Pol. Tyg. Lek. 20, 758, 1968.
2. Chojnowski A., Kluczek J. P.: PTPN Poznań, Prace Kom. Nauk. Rol. i Leśnych 26, 5, 1959.
3. Cornelius C. E., Burnham L. G., Hill H. E.: Am. Vet. Assoc. 142, 639, 1963.
4. Markiewicz K.: Pol. Arch. Weter. 8, 4, 1965.
5. Markiewicz K., Zarnowski E.: Wiad. Parazytol. nr 5—6, 1968.
6. Neuman V., Maderova V.: Vet. Medicina 14, 1960.
7. Reitman S., Frankel S.: Am. J. Clin. Path. 28, 56, 1957.

Adres autora: Elżbieta Kurska, Olsztyn-Kortowo, Zakład Diagnostyki Laboratoryjnej WSR.

Курска Э., Витчак К. — Сравнительное исследование аминотрансфераз сыворотки крови с применением метода по Reitman-Frankel и теста Fermognost.

Исследовали активность аспарагиназной и аламинной аминотрансфераз (AspAT, AlAT) в сыворотках крови 30 коров и 30 лошадей (свободных от симптомов заболевания). Исследования провели одновременно и в тех же условиях рутинным методом по Reitman-Franke и с применением тестов Fermognost: GOT-test и GPT-test продукции Germed Veb Arzneimittelwerk Dresden — DDR. Полученные данные подвергли статистической обработке. Установили, что между результатами полученными обоими методами нет существенных различий. В сыворотках крови оказывающих более высокую активность (AspAT у лошадей) повышаются тоже различия между результатами обоих методов но в границах допустимой ошибки. Авторы приходят к выводу что применение методов GOT-test и GPT-test Fermognost облегчает проведение этих исследований в лабораторной практике.

Kurska E., Witczak K. — The comparative determination of aminotransferases in serum acc. to Reitman — Frankel and by means of Fermognost test.

In sera of 30 healthy cows and 30 horses the activity of aspartic aminotransferase (AspAT) and alanine aminotransferase (AlAT) has been determined. The examinations were carried out acc. to Reitman-Frankel method and by the use of Fermognost tests: GOT test and GPT test produced by Germed Veb Arzneimittelwerk Dresden DDR. In order to compare the obtained findings and evaluate the usefulness of test method the determinations were done with those two techniques at the same time and under equal conditions. The results were evaluated statistically. There were not found any statistically significant differences between the series of experiments (Reitman-Frankel method and the employed tests). It was found that, in horses with the higher activity of AspAT the differences in activity of the enzymes determined with various methods increased. The deviations lie within the limits of permissible error. It was stated that the application of GOT test and GPT test (Fermognost) for the determination of aminotransferase activity was useful and facilitated the work in the laboratory.

GAWORUCHA E. W.: Stan sanitarny ścieków zakładów mięsnych, posiadających urządzenia oczyszczające. (Sanitarne sostojanije stocznych wod miasokombinatów, imiejuszczych oczysztnyje sooruzienija). Wietierinaria, (Moskwa) 46, 3, 43—44, 1970.

Przebadano ścieki 2 zakładów: I — okręgowego (oczyszczanie mechaniczne, osadniki z naturalną aeracją, pola osadowe, basen do chlorowania gazowego przez 30—40 min. i wpuszczanie do rzeki) i II — rejonowego (oczyszczanie biologiczne niekompletne, pola filtracyjne i wpuszczenie do rzeki).

Badanie bakteriologiczne ścieków wpuszczanych do rzeki zarówno chlorowanych, jak i niechlorowanych, obu zakładów wyosobniło liczne szczepy 12 gatunków salmonela.

Badanie dodatkowe wykazało, że dla odkażenia ścieków zakładów mięsnych ilość chloru resztkowego po chlorowaniu winna wynieść 133 mg/litr. Chlorowanie ścieków oczyszczonych mechanicznie, biologicznie i przez pola filtracyjne przy zawartości chloru resztkowego na poziomie 1,5 do 18 mg/l nie zapewnia należytego odkażenia ścieków.

T. J.

COTE J. F., CURTIS R. A., MC SERRY B. J., ROBERTSON J. M. C., KRONFELD D. S.: Ketoza bydła: częstość występowania objawów klinicznych, powikłania i zmiany w substancjach ketonowych krwi, glukozy i wolnych kwasach tłuszczowych. (Bovine ketosis: frequency and clinical signs, complications and alterations in blood ketons, gluose and free fatty acids). Can. Vet. Jour., 10, 179—188, 1969 (7).

Na 120 krowach z acetonemią przebadano częstość oraz stopień nasilenia 22 objawów klinicznych ketozy. Zwiększone łaknienie notowano u 85%, całkowitą jego utratę u 13% badanych krów. Hypolactemia występowała u 87%, ślinotok u 63% powiększenie macy u 63%, wyciek z dróg rodnych u 50% słaba kondycja u 40% badanych zwierząt. Jedynie u 16% krów obserwowano zbity kał pokryty śluzem. U 51 krów występowały zaburzenia poporodowe. W płazmie wrósł poziom AAA(aceton-acetocctan) i wolnych kwasów tłuszczowych oraz spadło stężenie wapnia i glukozy. Nie zaobserwowano istotnych zmian w zawartości magnezu i fosforu w surowicy i ilością krwinek czerwonych. Nasilenie i częstość występowania objawów ketozy wiązała się ściśle ze stanem hypoglikemii niż ze wzrostem stężenia AAA i wolnych kwasów tłuszczowych w surowicy.

Z. G.