

Porovnání hodnot krevní plazmy leguinů při použití tří analyzátorů

Z. KNOTKOVÁ,¹ E. KNOTKOVÁ, A. HRDÁ,¹ Z. KNOTEK^{1,2}

¹Klinika chorob ptáků, plazů a drobných savců, Fakulta veterinárního lékařství, Veterinární a farmaceutická univerzita Brno

²Klinik für Geflügel, Ziervögel, Reptilien und Fische, Veterinärmedizinische Universität Wien

SOUHRN

Knotková Z., Knotková E., Hrdá A., Knotek Z. **Porovnání hodnot krevní plazmy leguinů zelených (*Iguana iguana*) při použití CobasMira Plus, AA Series Spectrometer a analyzátoru VetScan VS2.** Veterinární klinika 2010;7:55-58.

Cílem práce bylo ověření biochemického analyzátoru VetScan VS2 pro stanovení biochemických parametrů v krevní plazmě leguinů zelených a porovnání naměřených hodnot s výsledky dosaženými u shodných vzorků při použití analyzátoru CobasMira Plus a spektrofotometru AA Series Spectrometer. Hodnoceno bylo 26 vzorků krevní plazmy, získaných odběrem krve od 18 dospělých zdravých leguinů zelených (*Iguana iguana*). Pro soubory naměřených hodnot byly určeny maximální a minimální hodnota, aritmetický průměr a směrodatná odchylka. Hodnoty byly porovnány pomocí párového t-testu. Koncentrace žlučových kyselin nelze možno statisticky porovnat, neboť analyzátor VetScan VS2 vyhodnotil u 23 z 26 vzorků plazmy koncentraci žlučových kyselin jako <35,00 μmol/l a u osmi vzorků se měřená koncentrace nacházela pod spodní mezí detekce přístroje CobasMira Plus. Párovým t-testem nebyly zjištěny statisticky významné rozdíly mezi naměřenými hodnotami ($p > 0,05$) pouze v případě koncentrací iontů vápníku a fosforu. Pro všechny ostatní parametry byl prokázán mezi oběma přístroji statisticky vysoce významný rozdíl ($p < 0,01$), případně statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$). Biochemický analyzátor VetScan VS2 se ukázal jako vhodný pro běžnou klinickou praxi.

SUMMARY

Knotková Z., Knotková E., Hrdá A., Knotek Z. **Comparison of blood plasma of Green Iguana (*Iguana iguana*) by CobasMira Plus, AA Series Spectrometer, and VetScan VS2 analyzer.** Veterinární klinika 2010;7:55-58.

The aim of this presented work was the verification of biochemical analyzer VetScan VS2 for determination of biochemical parameters in blood plasma of Green Iguana (*Iguana iguana*) and comparison of measured values with the results gained from the same samples measured by both CobasMira Plus analyzer and spectrophotometer, AA Series Spectrometer. Blood plasma of 26 samples was gained by blood sampling from 18 adult healthy Green Iguanas (*Iguana iguana*). For the groups of measured values were stated maximal and minimal values, arithmetical mean and standard deviation. Gained values were compared by means of paired t-test. Concentrations of bile acids were not statistically compared, because VetScan VS2 analyzer evaluated concentration of bile acids in 23 from 26 plasma samples as < 35.00 μmol/l, and in eight samples was measured concentration below lower outline of detection of CobasMira Plus instrument. Paired t-test findings did not show any statistically significant distinction amongst measured values ($p > 0.05$), only in case of calcium and phosphorus ion concentrations. For all other parameters was proved between both instruments statistically highly significant difference ($p < 0.01$), eventually statistically significant difference ($p < 0.05$). Biochemical analyzer VetScan VS2 proved to be useful for common clinical practice.

Úvod

Leguiní zelení představují významnou skupinu pacientů veterinárních klinik, zaměřených na exotická zvířata. Bezpečně lze u zdravých leguinů zelených odebrat 10 % celkového objemu krve.^{1,2} V běžné klinické praxi se od dospělých zdravých leguinů jednorázově odebírají 2 až 3 ml krve.³ Vhodným místem odběru je ventrální ocasní žíla (*vena coccygea ventralis*). Místo vpichu se nachází ve střední linii ventrální plochy ocasu, většinou ve druhé třetině délky ocasu od kloaky. Jako vhodný protisrážlivý prostředek pro

klinickou praxi se používá heparin (heparinát sodný nebo lithium heparinát).^{4,5} Pro laboratorní účely je preferována plazma před sérem, neboť srážení krve u plazů proces přípravy vzorku prodlužuje a rovněž získaný objem tekutiny pro další laboratorní zpracování je mnohem menší než v případě plazmy. Některé sledované parametry mohou být srážením krve změněny, například koncentrace celkové bílkoviny je v séru nižší než v plazmě⁶, a změněné mohou být i hodnoty některých elektrolytů.⁷ Pro základní posouzení celkového zdravotního stavu leguinů zelených se rutinně sledují koncentrace celkové bílkoviny, glukózy, alkalické fosfatázy (ALP), alani-

Vzorky krve smíchané s heparinem byly bezprostředně po odběru odstředěny (10 min., 14 000 otáček, mikrocentrifuga MPW-55, MPW Med. Instruments, Polsko) a krevní plazma ihned vyšetřena na automatickém analyzátoru CobasMira Plus Analyzer (Roche, Švýcarsko) a spektrofotometru AA Series Spectrometer (Thermo-electron Corporation, UK, V. Británie) v laboratoři Sekce chorob velkých zvířat FVL VFU Brno. Paralelně byly vzorky krevní plazmy analyzovány na přístroji VetScan VS2 (Abaxis, USA) na Klinice chorob ptáků, plazů a drobných savců FVL VFU Brno. Stanovení aktivit aspartátamino-transferázy, kreatininkinázy a určení koncentrací celkové bílkoviny, glukózy, žlučových kyselin, kyseliny močové a anorganického fosforu byly uskutečněny na automatickém analyzátoru CobasMira Plus Analyzer (Roche, Švýcarsko). Plazmatické koncentrace draslíku a celkového vápníku byly stanoveny pomocí spektrofotometru AA Series Spectrometer (Thermo-electron Corporation, V. Británie).

Pro měření na přístroji VetScan VS2 byly použity analytické rotory (Avian/Reptilian Profile Plus, VetScan, Abcis, USA) pro stanovení hodnot celkové bílkoviny, albuminu, globulinu, glukózy, vápníku, fosforu, draslíku, sodíku, aspartátamino-transferázy, kreatininkinázy, kyseliny močové a žlučových kyselin. Zasaditím rotoru do přístroje byla automaticky zahájena centrifugace i následná analýza. Celková doba stanovení biochemického profilu jednoho vzorku byla 12 minut.

Pro soubory naměřených hodnot byly určeny následující charakteristiky: velikost souboru (n), maximální a minimální hodnota (max, min), aritmetický průměr (x) a směrodatná odchylka (s). Mírou statistické významnosti zjištěných rozdílů byla zvolena hladina $p = 0,05$. Ke statistickému vyhodnocení byl použit počítačový program Excel (Windows XP, Microsoft). Hodnoty jednotlivých biochemických parametrů, získané použitím uvedených metod (CobasMira Plus Analyzer, spektrofotometr AA Series Spectrometer a VetScan VS2) byly porovnány pomocí párového t-testu. Koncentrace žlučových kyselin nebylo možno statisticky porovnat, neboť analyzátor VetScan VS2 vyhodnotil u 23 z 26 (88,5 %) vzorků plazmy koncentraci žlučových kyselin jako <35,00 $\mu\text{mol/l}$ (bez udání konkrétní hodnoty) a u osmi vzorků se měřená koncentrace nacházela pod spodní mezí detekce přístroje CobasMira Plus.

Výsledky

Výsledky vyšetření krevní plazmy získané při odběrech krve byly pro potřebu statistického zpracování sloučeny ($n = 26$). V tabulce 1 jsou pomocí párového t-testu porovnány údaje získané v daném vzorku krevní plazmy odlišnými přístroji. Párovým t-testem nebyly statisticky významné rozdíly mezi naměřenými hodnotami ($p > 0,05$) zaznamenány pouze v případě koncentrací iontů vápníku a fosforu. Pro všechny ostatní parametry byl prokázán mezi oběma přístroji statisticky vysoce významný rozdíl ($p < 0,01$), případně statisticky významný rozdíl ($p < 0,05$) pro hodnoty celkové bílkoviny.

Tab. 1 – Biochemický profil krevní plazmy leguána zeleného – srovnání výsledků naměřených přístroji CobasMira Plus a VetScan VS2

Parametry	Celková bílkovina		Glukóza		Kyselina močová	
	COBAS	VETSCAN	COBAS	VETSCAN	COBAS	VETSCAN
	g/l		mmol/l		$\mu\text{mol/l}$	
n	26	26	26	26	26	26
min	30,2	31,0	6,27	6,40	16,20	8,22
max	60,8	69,0	19,31	17,90	248,80	198,00
x	46,88	49,57	8,09	8,43	92,88	84,15
s	6,30	7,52	2,48	2,17	48,74	44,02
t-test	$p < 0,05$		$p < 0,01$		$p < 0,01$	
Parametry	AST		CK		Žlučové kyseliny	
	jkcat	jkcat	jkcat	jkcat	jkcat	jkcat
	COBAS	VETSCAN	COBAS	VETSCAN	COBAS	VETSCAN
n	26	26	26	26	18	3
min	0,05	0,20	3,13	0,00	0,29	2
max	0,89	0,90	220,66	136,50	37,63	13
x	0,29	0,36	51,09	35,23	–	–
s	0,18	0,16	61,29	49,86	–	–
t-test	$p < 0,01$		$p < 0,01$		–	
Parametry	K		Ca		P	
	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l	mmol/l
	AA Series Spectrometer	VETSCAN	AA Series Spectrometer	VETSCAN	COBAS	VETSCAN
n	26	26	26	26	26	26
min	2,85	3,70	2,03	2,57	1,95	1,34
max	7,57	6,80	18,14	6,46	5,91	5,22
x	4,30	5,01	3,92	3,36	2,27	2,18
s	0,85	0,73	3,14	1,02	1,03	0,71
t-test	$p < 0,01$		$p > 0,05$		$p > 0,05$	

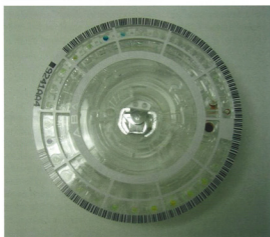
Diskuse

Pro biochemická vyšetření krevní plazmy jsou v současné době k dispozici různé typy automatických analyzátorů, které se mohou lišit přesností stanovení, technickou náročností pro obsluhující personál i pořizovacími a provozními náklady.¹⁰ Zatímco přístroje typu CobasMira Plus patří mezi zařízení centrálních analytických laboratoří univerzitních pracovišť, automaty typu VetScan VS2 jsou určeny pro použití přímo v klinických provozech. S ohledem na význam, jaký mají výsledky stanovení biochemického profilu pacientů ve veterinární medicíně, je srovnání takových přístrojů při analýze shodných vzorků krevní plazmy od zdravých zvířat důležitější.¹⁰

Statistické vyhodnocení naměřených hodnot neprokázalo rozdíl při vzájemném porovnání výsledků získaných pomocí analyzátorů CobasMira Plus a VetScan VS2 při stanovení koncentrace anorganického fosforu a při vzájemném porovnání měření pomocí spektrofotometru AA Series Spectrometer a analyzátoru VetScan VS2 pro koncentraci celkového vápníku. Pro všechny ostatní sledované parametry byl mezi přístroji CobasMira Plus a VetScan VS2 prokázán statisticky vysoce významný, případně statisticky významný rozdíl. Znamená to, že pro čistě statistické hodnocení výsledků nelze hodnoty naměřené na odlišných analyzátoch zařadit do jednoho souboru. Z pohledu klinické praxe je však závažnějším kritériem, zda jsou pomocí odlišných analyzátorů shodně odhaleny významné odchylky od fyziologických norm. Tedy, zda jsou odlišné přístroje schopny stejně potvrdit klinicky závažné nálezy.



Obr. 1 – Biochemický analyzátor VetScan VS2 (Abaxis, USA)



Obr. 2 – Detail rotoru po stanovení biochemického profilu krve u plazů a ptáků

naminotransferázy (ALT), aspartátaminotransferázy (AST), kreatinkinázy (CK), kyseliny močové, cholesterolu, triacylglycerolů, vápníku (Ca) a fosforu (P). Praktický význam může mít v konkrétních případech i stanovení koncentrace sodíku (Na), draslíku (K), žlučových kyselin, chloridů (Cl), kreatininu, močoviny, aktivity gamaglutamyltransferázy (GMT) a laktátdehydrogenázy (LDH).^{2,4,9}

V běžné klinické praxi lze pro zpracování a analýzu parametrů krve použít dva základní postupy. V prvním případě se odebraná krev (případně sérum nebo plazma) odesílá k laboratornímu vyšetření do specializovaných laboratoří, které disponují potřebnými automatickými analyzátoři. Druhým způsobem je určení parametrů krve přímo na veterinární klinice. K tomuto cíli byly zkonstruovány jednoduché automatické přístroje, které nevyžadují náročné zaškolení

a ni komplikovaný servis. Dalšími výhodami je nesporně rychlost stanovení a možnost použití takových přístrojů kdykoliv po dobu 24 hodin, včetně nočních akutních případů. Na druhé straně není vyloučeno, že s relativně jednoduchými automaty může být dosaženo odlišných výsledků, než jaké poskytují tradiční přístroje centrálních laboratoří. Z pohledu veterinární praxe u vzácných exotických pacientů je důležitá spolehlivost správných výsledků a možnost jejich porovnání s informacemi v odborné literatuře.

Cílem této práce bylo ověření biochemického analyzátoru VetScan VS2 (Abaxis, USA) (obr. 1) pro stanovení biochemických parametrů v krevní plazmě plazů v běžné klinické praxi. VetScan VS2 je přístroj pracující na principech tzv. mokré chemie. Většina metod je ve svých principech v souladu s metodami standardizovanými v České republice a harmonizována s doporučeními Evropské unie. Obsluha přístroje je jednoduchá a nevyžaduje náročné školení. Ke stanovení až 14 biochemických hodnot (analýtů) stačí 100 μ l krve, krevní plazmy nebo krevního séra. Objem 100 μ l vzorku je odebrán ze zkumavky dodané mikropipetou a přenesen přímo do rotoru s reagenciemi (obr. 2). Rotor má v čárovém kódu zaneseno datum expirace a kalibrační údaje pro všechny metody, které v příslušném rotoru jsou. V mikrokyvetkách rotoru jsou odváženy veškeré reagenty pro příslušnou analýzu. V průběhu centrifugační fáze se ředící roztok a plazma smísí s reagenty. Měření jednotlivých parametrů je fotometrické.

Bylo provedeno srovnání dosažených výsledků s analýzami shodných vzorků krevní plazmy, které byly realizovány na automatickém analyzátoru CobasMira Plus Analyzer (Roche, Švýcarsko) a spektrofotometru AA Series Spectrometer (Thermoelectron Corporation, V. Británie). Jako modelová zvířata byli vybráni leguáni zelení dlouhodobě chovaní na Klinice chorob ptáků, plazů a drobných savců Fakulty veterinárního lékařství VFU Brno.

Materiál a metody

Sledování bylo provedeno u skupiny experimentálních leguánů zelených (*Iguana iguana*), deseti samců a osmi samic, stáří 6–10 let. Všichni ještěři byli v dobrém zdravotním stavu a nevykazovali žádné příznaky onemocnění. Nezaměnitelně označeni všech experimentálních plazů bylo zajištěno pomocí elektronických transpondérů (mikročipů), umístěných do podkoží na levé straně krku. Odběrům krve předcházel hladovka po dobu 48 hodin, přístup k pitné vodě nebyl omezen. Před vlastním odběrem krve byla u každého leguána provedena kontrola čísla mikročipu pomocí ručního čtečho zařízení. Ještěři byli fixováni ve hřbetní poloze a odběr byl prováděn z ventrální ocasní žíly. Místo odběru bylo nejprve dezinfikováno ajatinem (Ajatin sol. 10%, Profarma, Česká republika). Od každého leguána bylo odebráno 1,5 ml krve, která byla v mikrozukmavkách typu Eppendorf ihned smíchána s 10 μ l antikoagulačního prostředku (Heparin inj. 5 000 m. j./ml, Lentiva, Česká republika). Místo odběru bylo překryto leukoplasti. Před umístěním zpět do terária byla u každého leguána zkontrolována aktuální hmotnost.

Výsledky biochemického profilu krevní plazmy leguánů zelených hodnocené pomocí analyzátoru CobasMira Plus byly v rozmezí, které autoři uvádějí jako fyziologické rozmezí hodnot pro zdravé leguány zelené.¹¹⁻¹⁴ To platí i pro poměrně vysoké koncentrace vápníku, které byly stanoveny u několika samic, neboť odpovídají koncentracím v plazmě samic v období tvorby ovariálních folikulů.¹⁵ Totéž je možné konstatovat pro naměřené vyšší koncentrace fosforu u několika samic při použití spektrofotometru AA Series Spectrometer. Vyšší hodnoty kreatininu v několika vzorcích je možno interpretovat jako vliv komplikací při odběru krve, například podrážděním svaloviny ocasu při opakovaném vpichu jehly.

Výsledky biochemického profilu krevní plazmy leguánů zelených získané pomocí analyzátoru VetScan VS2 se rovněž nacházely ve fyziologickém rozmezí pro zdravé leguány zelené.¹¹⁻¹⁴ Vyšší hodnoty koncentrace celkového vápníku, anorganického fosforu a aktivity kreatininu byly zaznamenány na analyzátoru VetScan VS2 ve stejných vzorcích plazmy jako při použití přístroje CobasMira Plus nebo spektrofotometru AA Series Spectrometer.

Z výsledků měření je patrné, že pokud byly pomocí analyzátoru VetScan VS2 zjištěny hodnoty vyšší, než jsou udávány jako fyziologické, potom to bylo ve stejných vzorcích krevní plazmy, ve kterých byly takové odchylky zjištěny i pomocí analyzátoru CobasMira Plus nebo spektrofotometru AA Series Spectrometer.

Závěr

Srovnání výsledků získaných na automatickém analyzátoru CobasMira Plus Analyzer (Roche, Švýcarsko), spektrofotometru AA Series Spectrometer (Thermoelectron Corporation, V. Británie) a přenosném centrifugačním biochemickém analyzátoru VetScan VS2 (Abaxis, USA) prokázalo pro většinu sledovaných parametrů významné rozdíly. Naměřené hodnoty se však pohybovaly ve fyziologickém rozmezí a pokud byly v některém vzorku zjištěny odchylky, zaznamenaly to shodně všechny použité analyzátoři.

Z toho vyplývá, že není vhodné střídát využití různých přístrojů při opakovaném vyšetřování jednoho pacienta, ale biochemický analyzátor VetScan VS2 (Abaxis, USA) je použitelný pro klinickou praxi. Pro klinickou veterinární praxi je v rámci biochemického vyšetření krve plazmů možné úspěšně využít nejen služeb renomovaných biochemických laboratoří, ale i přenosný biochemický analyzátor, který má veterinární lékař k dispozici přímo na pracovišti.

Poděkování

Stanovení biochemických parametrů na přístrojích Cobas Mira Plus a spektrofotometru AA Series Spectrometer byla uskutečněna v laboratoři Kliniky chorob přežvýkavců FVL VFU Brno. Autoři děkují firmě Inlab Medical, s. r. o., za technickou spolupráci při využití analyzátoru VetScan VS2.

Literatura:

1. Knotková, Z., Knotek, Z., Sedláková, D., Šindelář, M. Krev plazmů III. Základní biochemické parametry. Veterináriství 1997;47:9-12.
2. Campbell, T. W. Hematology of reptiles. In: Thrall, M. A. Veterinary hematology and clinical chemistry. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2004:259-276.
3. Trnková, S. Hematologické a biochemické profily vybraných onemocnění leguánů zelených. Odborná práce FVL VFU Brno, 2005:66.
4. Knotek, Z., Knotková, Z., Halouzka, R., Modrý, D., Hájková, P. Nemoci plazů. ČAVLMZ Brno, 199:275.
5. Knotek, Z., Hauptman, K., Knotková, Z., Hájková, P., Tichý, F. Haemogram and plasma biochemistry in green iguanas with renal disease. Acta Veterinaria Brno 2002;71:333-340.
6. Campbell, T. W. Clinical chemistry of reptiles. In: Thrall, M. A. Veterinary hematology and clinical chemistry. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 2004:493-498.
7. Campbell, T. W. Clinical pathology of reptiles. In: Mader, D. R. Reptile medicine and surgery. WB Saunders Company, Philadelphia, 2006:453-470.
8. Hrdá, A. Plazmatické koncentrace žlučových kyselin u leguánů zelených při diagnostice hepatopatií. Odborná práce FVL VFU Brno, 2008:53.
9. Greenacre, C. B., Flatland, B., Souza, M. J., Fry, M. M. Comparison of avian biochemical test results with Abaxis VetScan and Hitachi 911 analyzers. Journal of Avian Medicine and Surgery 2008; 22:291-299.
10. Divers, S. J., Redmayne, G., Aves, E. K. Haematological and biochemical values of 10 green iguanas (Iguana iguana). Veterinary Record 1996, 138:203-205.
11. Bruder, M. Blutreferenzwerte bei Grünen Leguanen (Iguana iguana). Thesis, Univ München, 1998:113.
12. Harr, K. E., Allemann, A. R., Denis, P. M., Maxwell, L. K., Lock, B. A., Bennett, R. A., Jacobson, E. R. Morphologic and cytochemical characteristics of blood cells and hematologic and plasma biochemical reference in green iguanas. Journal of the American Veterinary Medical Association 2001; 218:915-921.
13. Pejřilová, S. Ontogenetická studie hematologických a biochemických parametrů krevní plazmy leguána zeleného (Iguana iguana rhinoloph). Disertační práce, FVL VFU Brno, 2004:125.
14. Knotková, Z., Pejřilová, S., Trnková, S., Matoušková, O., Knotek, Z. Influence of reproductive season upon plasma biochemistry values in green iguanas. Acta Veterinaria Brno 2005;74:515-520.

Adresa autora:

MVDr. Zora Knotková, CSc.

Klinika chorob ptáků, plazů a drobných savců

FVL VFU Brno

Palackého 1-3

612 42 Brno

e-mail: knotkovaz@vfu.cz