DIAGN. LAB., 1970, T. VI, NR 3

MIECZYSŁAW TRZĄSKI

KILKA UWAG, DOTYCZĄCYCH PRÓBY TYMOLOWEJ ORAZ JEJ PRZYSTOSOWANIA DO AUTOMATYCZNEGO APARATU „CLINOMAK II" *)

Z Centralnego Laboratorium Centralnego Szpitala Klinicznego MSW
w Warszawie
Kierownik: dr farm. *M. Trząski*

Próbę tymolową przystosowano do automatycznego wykonania na aparacie „Clinomak II". Stwierdzono, że na wynik w/w próby wywierają wpływ: pH i skład buforu, temperatura oraz sposób kalibracji. Porównanie metody zautomatyzowanej z metodą manualną wykazało całkowitą zgodność wyników. W przypadku badania surowic żółtaczkowych przy obliczaniu wyników należy zastosować odpowiednią poprawkę.

Próba tymolowa wprowadzona do diagnostyki laboratoryjnej przez Mac Lagana należy do grupy tzw. prób białkowych. Polega ona na wytrącaniu się w surowicy kompleksu globulino-tymolo-lipidowego. Dodatni wynik próby tymolowej świadczy o dys- lub paraproteinemii. Mimo że mechanizm próby nie został całkowicie wyjaśniony, jest ona w dalszym ciągu szeroko stosowana w praktyce laboratoryjnej. Z tego też powodu postanowiono przystosować próbę tymolową do automatycznego aparatu „Clinomak II" (5).

Przy wykonywaniu próby tymolowej największą trudność stanowi kalibrowanie metody, przede wszystkim dlatego, że związek pomiędzy kalibrowaniem a samą próbą jest bardzo luźny i tylko umowny. Ostatnio ukazały się wprawdzie na rynku odpowiednie surowice wzorcowe (13), ale dla większości laboratoriów w naszym kraju nie są one dostępne.

Richterich (8) wprowadził nowy sposób kalibrowania próby tymolowej przy pomocy „Zefirolu", zmieniając równocześnie skład buforu tymolowego. W praktyce laboratoryjnej znalazło zastosowanie wiele innych jeszcze modyfikacji klasycznej metody *Mac Lagana* (1, 2, 3, 4, 7, 10). Modyfikacje te polegają głównie na odmiennym od klasycznego sposobie kalibrowania i na zmianach pH buforu weronalowego.

Biorąc pod uwagę możliwość zautomatyzowania próby tymolowej wydawało się celowym przebadanie głównych parametrów technicznych metody, takich jak pH i skład buforu oraz sposób jej kalibrowania.

---

*) Firma Polimak, Roma, Viale Parioli 101 c.

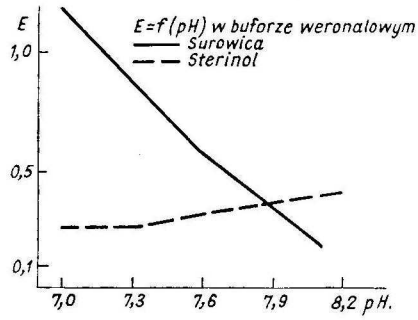
CZĘŚĆ DOŚWIADCZALNA

Punkt wyjścia naszych badań stanowiły: klasyczna metoda *Mac Lagana* (6, 7) z zastosowaniem buforu weronalowego o pH 7,8 oraz sposób kalibrowania wg *Kingsbury'ego* (7). Zmętnienia wzorców oznaczano po upływie 5 minut.

Wpływ pH buforu weronalowego na wielkość zmętnienia surowicy i sterinolu

Zmętnienie wyrażano w wartościach gęstości optycznej E mierzonych przy filtrze 660 nm. Bufory doprowadzano do żądanego pH za pomocą 1 N kwasu octowego i 1 N roztworu NaOH. Wykazano, że zmętnienie surowicy wzrasta bardzo szybko w miarę obniżania się pH buforu, zaś zmętnienie roztworów sterinolu w tych warunkach nieznacznie maleje (ryc. 1).

Przebieg krzywych zmętnienia surowicy i sterinolu w buforze Tris — kwas maleinowy (8) jest prawie identyczny jak w buforze weronalowym.



Ryc. 1. Wpływ pH buforu weronalowego na wielkość zmętnienia surowicy i sterinolu.

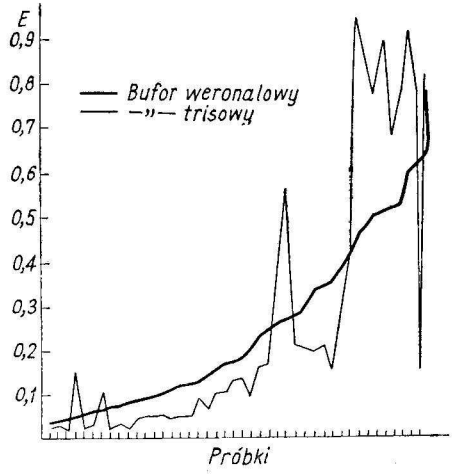
Wpływ rodzaju buforu na wyniki próby tymolowej

Wykonano 81 równoległych oznaczeń na różnych surowicach, posługując się buforem weronalowym o pH 7,8 oraz buforem Tris — kwas maleinowy o tym samym pH.

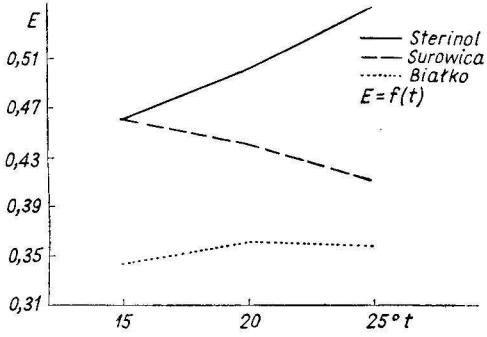
Wykazano dużą zgodność wyników w zakresie niskich wartości zmętnienia. Przy większych zmętnieniach spotyka się duże rozbieżności (ryc. 2).

Wpływ temperatury na wielkość zmętnienia surowicy i sterinolu w buforze weronalowym o pH 7,8

W zakresie temperatur 15 do 25°C wartości zmętnienia sterinolu wzrastają wraz ze wzrostem temperatury. Natomiast zmętnienie surowicy maleje w tych warunkach. Wykazano też, że wartości zmętnienia białka wytrącanego kwasem sulfosalicylowym (kalibracja wg *Kingsbury*'ego) w podanym wyżej zakresie temperatur zmieniają się w niewielkim tylko stopniu (ryc. 3).



Ryc. 2. Wpływ rodzaju buforu na wyniki próby tymolowej.



Ryc. 3. Wpływ temperatury na wielkość zmętnienia surowicy i sterinolu, po dodaniu odczynnika tymolowego w buforze weronalowym i na wielkość zmętnienia białek wytrąconych kwasem sulfosalicylowym.

Przebieg wykresów kalibracyjnych

Porównywano przebieg wykresu kalibracyjnego sterinolu w buforze weronalowym i buforze Tris — kwas maleinowy oraz wykresu kalibracyjnego sporządzonego wg *Kingsbury*'ego. Wykresy kalibracyjne wykazują dużą zbieżność. Standaryzacja 0,2% (w/v) roztworu sterinolu została przeprowadzona w oparciu o wykres wg *Kingsbury*'ego.

Porównanie wyników próby tymolowej wykonanej manualnie z wynikami otrzymanymi przy pomocy aparatu „Clinomak II"

Oznaczenia przeprowadzano przy użyciu buforu weronalowego o pH 7,8, a kalibrację przy pomocy sterinolu. Wykazano, że przy odczytywaniu wartości zmętnienia przy 660 nm wyniki metody manualnej i metody zautomatyzowanej są zbliżone, o ile wyniki nie przekraczają 2 j. Mac Lagana. Powyżej tej granicy obserwuje się coraz większe rozbieżności,

przy czym metoda automatyczna daje z reguły niższe wyniki. W celu usunięcia tych rozbieżności dalsze odczyty wykonywano przy długości fali 450 nm. W surowicach z wysokim poziomem bilirubiny należy w tych warunkach wprowadzić poprawkę. Od odczytanego wyniku próby tymolowej na każde 2,5 μg bilirubiny/100 ml surowicy należy odjąć 1 jednostkę Mac Lagana. Przy zastosowaniu tak zmienionej procedury uzyskano wysokiego stopnia korelację wyników metody manualnej z metodą zautomatyzowaną (r = 0,95).

OMÓWIENIE WYNIKÓW

Z przeprowadzonych wyżej badań wynika, że próbę tymolową należy wykonywać w warunkach stałego pH, stałej temperatury i przy zastosowaniu określonego rodzaju buforu oraz sposobu kalibracji. Nawet niewielkie odstępstwa od standardowych warunków oznaczenia, zwłaszcza w zakresie pH prowadzą do błędnych wyników, tym bardziej że przy zmianie pH zmętnienie surowicy zmienia się w przeciwnym kierunku niż zmętnienie wzorca sterinolowego. Na wyniki próby tymolowej wywiera również wpływ skład buforu tymolowego. Niektóre surowice w różnych buforach mogą wykazywać takie samo lub zbliżone zmętnienie, inne natomiast, zwłaszcza w przypadkach dysproteinemii wykazują duże różnice zmętnień w zależności od składu buforu (11).

Istotne znaczenie ma również wpływ temperatury. Z uwagi na to, że w zakresie od 15 do 25°C (temperatura pokojowa) obserwuje się wpływ zmian temperatury na wielkość zmętnienia surowicy i sterinolu, oznaczenia należy przeprowadzać w stałej temperaturze, najlepiej w temperaturze około 20°C.

Wydaje się, że zagadnienie kalibrowania próby tymolowej pozostaje w dalszym ciągu sprawą otwartą. Korzystanie z wzorców sterinolowych (9, 12) lub „zefirolowych" (8) jest niewątpliwie znacznie łatwiejsze i korzystniejsze niż korzystanie z wzorców białkowych (met. *Kingsbury*'ego), które nie mają żadnego powiązania z buforem tymolowym. Wprowadzenie wzorców sterinolowych względnie „zefirolowych" umożliwia też zautomatyzowanie próby tymolowej. Jednakże w celu skorelowania kalibracji wykonanej przy pomocy sterinolu z dotychczas obowiązującą kalibracją należy wzorzec sterinolowy skalibrować na białkowym wykresie kalibracyjnym *Kingsbury*'ego. Należy też podkreślić, że wzorzec sterinolowy jest w zasadzie nieograniczenie trwały.

Zalecana procedura wykonania próby tymolowej

A. Wersja manualna

1. Do 6 ml odczynnika tymolowego w buforze weronalowym o pH 7,8 ± 0,05 dodać 0,1 ml badanej surowicy.
2. Równocześnie do tej samej ilości odczynnika tymolowego dodać 0,1 ml 0,2% (w/v) roztworu sterinolu uprzednio skalibrowanego met. *Kingsbury*'ego.
3. Po 30 minutach odczytać wartość zmętnienia przy 660 nm w kuwetach 1 cm.

Wynik obliczyć metodą algebraiczną.

B. Metoda zautomatyzowana („Clinomak II")

1. Objętość próbki i wzorca 50 µl.

2. Bufor tymolowy — 2, 5ml (wentyl — V_1)

3. Warunki oznaczenia: długość fali — 450 nm, kompensacja — 0, czułość — 0,45.

4. Po 30 minutach wyłączyć aparat rejestrujący.

5. Wyniki wyliczyć z wykresu kalibracyjnego sporządzanego dla każdej serii oznaczeń.

6. O ile w badanej surowicy poziom bilirubiny jest podwyższony od wyniku, należy odpowiednio skorygować (patrz wyżej).

C. Kalibrowanie

1. Sporządzić wykres kalibracyjny met. *Kingsbury*'ego.

2. Wartości zmętnień odczytać po upływie 5 minut od chwili dodania roztworu kwasu sulfosalicylowego.

3. Przygotować 0,2% (w/v) roztwór sterinolu i w temperaturze 20°C opisanym wyżej sposobem oznaczyć w nim wielkość zmętnienia w jednostkach Mac Lagana.

М. Тжонски

НЕСКОЛЬКО ЗАМЕЧАНИЙ, КАСАЮЩИХСЯ ТИМОЛОВОЙ ПРОБЫ А ТАКЖЕ ЕЕ ПРИСПОСОБЛЕНИЯ ДЛЯ АВТОМАТИЧЕСОГО АППАРАТА „CLINOMAK II"

Содержание

Тимоловую пробу приспособлено для автоматического выполнения с помощью аппарата „Clinomak II". Обнаружено, что на результат вышеупомянутой пробы оказывают влияние: pH и состав буфера, температура а также способ калибровки. Сравнение автоматического метода с ручным дало полное соответствие результатов. В случае исследования сывороток желтушных при вычислении результатов следует использовать соответствующую поправку.

M. Trząski

SOME REMARKS ON THE THYMOL TURBIDITY TEST AND ITS ADAPTATION TO AUTOMATIC SYSTEM „CLINOMAK II"

Summary

The thymol turbidity test was adapted to automatic performance using apparatus „Clinomak II". It has been stated that the results were influenced by pH and kind of buffer solution, temperature and calibration technique. The comparison of both methods: automatic and manual gave good agreement of results obtained.

In order to obtain good results with icteric sera it was necessery to take into consideration the special correction coefficient.

PIŚMIENNICTWO

1. *Goetze E.*: Einrichtung und Methoden des Klinischen Laboratoriums, VEB Gustav Fischer, Verlag, Jena 1963. — 2. *Hallmann L.*: Klinische Chemie und Mikroskopie, Georg Thieme, Verlag, Stuttgart, 1960. — 3. *Henning N.*: Klinische Laboratoriums-diagnostik, Urban Schwarzenberg, München u. Berlin, 1960. — 4. *Homolka J.*: Diagnostyka biochemiczna, PZWL, Warszawa, 1961. — 5. *Janecki J., Krawczyński J., Dukwicz A.*: Diagn. Labor., 1969, 5, 305. — 6. *Krawczyński J., Osiński T.*: Laboratoryjne metody analityczne, PZWL, Warszawa, 1959. — 7. *Merck E.*: Medizinisch-chemische Untersuchunsmethoden, Verlag, Chemie, Weinheim, 1962. — 8. *Richterich R.*: Klinische Chemie, S. Kargel Basel (Schweiz), New York, 1965. — 9. *Rolski S.*: Chemia środków leczniczych, PZWL Warszawa, 1968. — 10. *Tulczyński M.*: Metody laboratoryjne diagnostyki klinicznej, PZWL, Warszawa, 1962.

11. *Wuhrmann F., Märki H. H.*: Dysproteinämien und Para-proteinämien, Schwabe Verlag Basel (Stuttgart), 1963. — 12. Farmakopea Polska IV, t. I, PZWL, 1965. — 13. Zbiór metod firmy Polimak do aparatu Clinomak II, Roma, 1969.

Wpłynęło dnia 4. XII. 1969

Adres autorów: Dr M. Trząski, Warszawa, ul. Komarowa. Centralny Szpital Kliniczny MSW