

zależności od poziomu białka i dodatku aminokwasów w dawce pokarmowej wykazano, że dodatek nitrowinu do paszy w dawce 20 mg/kg dawał dziennie przyrosty ciężaru ciała w granicach 35 g tj. o 2,8% wyższe niż u zwierząt żywionych z dodatkiem chemostymulatorów. Reasumacją tych badań jest wniosek o celowości stosowania nitrowinu jako chemicznego stymulatora wzrostu tuczników.

W badaniach nad zastosowaniem nitrowinu w żywieniu cieląt stwierdzono, że preparat w dawce 40 mg/kg paszy wpływał w sposób istotny na ciężar ciała i jego dzienne przyrosty u zwierząt doświadczalnych, które zwiększyły się w miarę wzrostu dodatku nitrowinu do dziennej dawki pokarmowej. W miarę zwiększania jego dodatku stwierdzono istotnie lepsze wykorzystanie składników pokarmowych paszy na przyrost ciężaru ciała. W końcowych wnioskach podkreślono, że nitrowin wpływa korzystnie na przyrosty dzienne ciężaru ciała i wykorzystania paszy w wychowie cieląt.

Badania nad dodatkiem nitrowinu do paszy na przebieg i ekonomikę opasania młodego bydła rzeźnego wykazały, że dodatek preparatu w dawce 20 mg/kg paszy zwiększa o 61 g dzienne przyrosty ciężaru ciała, 0,6% polepsza wykorzystanie składników pokarmowych na przyrost 1 kg ciężaru ciała, o 13 dni skraca okres opasu i około 2 zł powodował potaniecie kosztów produkcji 1 kg ciężaru ciała.

Na podstawie przytoczonych w niniejszym opracowaniu fragmentów, nie wszystkich badań żywieniowych, nad zastosowaniem Zn-bacytacyliny i nitrowinu produkcji krajowej jako biologicznych i chemicznych stymulatorów wzrostu zwierząt, można stwierdzić, że nie ustępują one w niczym analogicznym preparatom zagranicznym i mogą być stosowane w celu zwiększania dziennych przyrostów ciężaru ciała i zmniejszenia zużycia paszy w produkcji zwierzęcej.

Piśmiennictwo

1. Wojtatowicz T.: Chemizacja żywienia zwierząt t. II BW. Chemia W-wa, w druku.
2. Anon. Chem. Eng. News. 48, 27, 44, 1970.
3. Anon. Chem. a Ind. 36, 1155, 1970.
4. Anon. Drug. a Cosm. Ind. 30, september, 1969.
5. Anon. Drug. Trade News. 45, 8, 12, 1970.
6. Anon. Drug. Trade News. 45, 20, 53, 1970.
7. Anon. Pharm. Ind. 2, 153, 1970.
8. Anon. Pharm. Ind. 4, 353, 1970.
9. Anon. Natur. 228, 5271, 499, 1970.
10. Materiały Sesji Naukowej „Pozostałości w tkankach po stosowaniu oxytetracyliny w żywieniu i leczeniu zwierząt” Warszawa, luty 1971, BW „Chemia”, Warszawa 1972.
11. Mozgow J.: Farmakologiczne stymulatory w hodowli zwierząt PWRiL, Warszawa, 55, 1970.
12. Niepublikowane badania znajdujące się w archiwum Zakładu Doświadczalnego przy Kutnowskich Zakładach Farmaceutycznych „Polfa”.
13. Sabiniewicz S., Wojtatowicz T.: Chemizacja żywienia zwierząt t. I BW „Chemia”, Warszawa, 24, 1973.
14. Smith H.: Vet. Rec. 83, 143, 1968.
15. Wojtatowicz Z.: Chemizacja żywienia zwierząt t. II BW „Chemia” Warszawa, w druku.
16. Wojtatowicz Z.: Przemysł Chemiczny, 11, 620, 1975.
17. Wojtatowicz Z.: Przemysł Chemiczny, 7, 353, 1977.
18. Wojtatowicz Z.: Nowości Farmacji i Medycyny, 1 Wet. 61, 1975.

Adres autora: dr Zbigniew Wojtatowicz, ul. Kr. Aldony 14/2, 03-928 Warszawa.

PATOLOGIA I TERAPIA

MARIAN GRUNDBOECK

Ocena i próby usprawnienia

hematologicznego rozpoznawania białaczki bydła metodą „kropek”

Z Pracowni Patologii Komórkowej Instytutu Weterynarii w Puławach

W 1967 r. na łamach Medycyny Weterynaryjnej opisana została uproszczona metoda badania krwi bydła w kierunku białaczki (3). Polegała ona na nakładaniu na szkiełko mikroskopowe standardowych kropelek krwi tzw. „kropek”, a następnie hemolizowaniu ich, barwieniu i obliczaniu limfocytów na określonej powierzchni. Uzyskane wartości były oceniane przy pomocy specjalnej tabeli, będącej modyfikacją postaci białaczkowego klucza getyndzkiego. Metoda ta została wprowadzona do krajowej akcji rozpoznawania białaczki i była wykorzystywana we wszystkich zakładach higieny weterynaryjnej oraz w wielu innych pracowniach diagnostycznych.

Kontrolne preparaty przesyłane z zakładów higieny weterynaryjnej do Instytutu Weterynarii wykazały, że najczęściej spotyka się „kropki” o średnicy 1,2 i 1,3 mm. W nielicznych pracowniach przeważały preparaty o średnicy 1,4

a tylko w pojedynczych przypadkach o średnicy 1,1 i 1,5 mm. Ponieważ metoda oryginalna została oparta na preparatach o średnicy 1,2 mm było jasne, że powiększenie rozmiaru „kropek” musi spowodować zawyżenie wyników, co między innymi było sygnalizowane w pracy Balbierza i wsp. (1). Porównanie materiałów przesyłanych przez różne pracownie wykazało ponadto wielką zależność jakości preparatów od umiejętności pracownika wykonującego je. „Kropki” o wielkości mniej ujednocnionej niewątpliwie prowadziły do wyników obciążonych większym błędem, a zatem mających małe szanse powtarzalności.

Szulec (7, 8) zaproponowała, by w uproszczonej metodzie, zwanej przez nią „metodą terenową” oprócz bezwzględnej liczby limfocytów oznaczać w tych samych „kropkach” odsetek tych komórek i stosować go do dodatkowej oceny prób wykazujących limfocytozę bezwzględną.

Jako górną granicę normy autorka proponuje przyjąć wartość 80% limfocytów dla młodzieży i 75% dla bydła dorosłego. Określenie granicznych wartości uważa jednak autorka za „sprawę otwartą”. Muszyński (6) w swych badaniach objętych pracą doktorską posłużył się również omawianą metodą zarówno w postaci oryginalnej jak i zmodyfikowanej przez Szulc, stwierdzając we wnioskach: „W masowych badaniach hematologicznych najbardziej celową jest metoda uproszczona z interpretacją wg klucza getyndzkiego”.

W Niemieckiej Republice Demokratycznej analizę omawianej metody przeprowadzili Kupsch i Mieth (4) stwierdzając, że w zakresie wartości prawidłowych wg klucza getyndzkiego wykazuje ona 94,7-procentową zgodność z rozpoznaniem opartymi na klasycznej metodzie badania krwi. W zakresie białaczkowym zgodność rozpoznania wynosi 87,5%. Zdaniem cytowanych autorów metoda uproszczona nadaje się do ogólnej oceny stad, nie można jednak wyłączać na niej oprócz akcji zwalczania białaczki.

Obok niedokładności wynikających z nierównej wielkości „kropek” metoda nastęrczała czasem dodatkowych trudności, gdyż preparaty w roztworze formaliny nie zawsze ulegały hemolizie lub hemoliza następowała tylko częściowo, co w konsekwencji utrudniało lub całkiem uniemożliwiało przeprowadzenie badania.

Ujemne strony omawianej techniki, jak również powszechne wprowadzenie do badań liczników elektronicznych spowodowały, że metoda uproszczona wyszła stopniowo z użycia.

Celem niniejszej pracy jest:

a) analiza niedomóg metody i przynajmniej częściowe ich usunięcie poprzez wprowadzenie niezbędnych modyfikacji;

b) określenie roli, którą mogłaby odgrywać metoda w obecnych warunkach.

Materiał i metody

Badania przyczyn zahamowania hemolizy

Krew 6 krów świeżą i konserwowaną odczynnikiem wersenianowo-formalinowym użyto do sporządzenia preparatów „kropkowych”, które suszono:

- w normalnych warunkach laboratoryjnych,
- w termostacie (37°C),
- pod promiennikiem podczerwieni,
- w lodówce (4°C),
- w temperaturze pokojowej po uprzednim kilkunastogodzinnym pozostawieniu preparatów w komorze wilgotnej.

f. w szczelnym naczyniu, do którego wstawiono odkrytą parowniczkę z płynną gnojowicą.

Nadto sporządzono preparaty z krwi konserwowanej 2-, 4- i 6-krotnie większą ilością odczynnika przeciw krzepnięciu. Preparaty były hemolizowane, a następnie barwione w czasie 2, 24 i 48 godzin licząc od chwili wyschnięcia.

Badanie sposobu barwienia się preparatów

Preparaty barwiono sposobem podanym w oryginalnym przepisie (sudanem czarnym i błękitem metylenowym), a nadto:

- barwnikiem Giemsy,
- barwnikiem May Grünwalda,
- barwnikiem Wrighta.

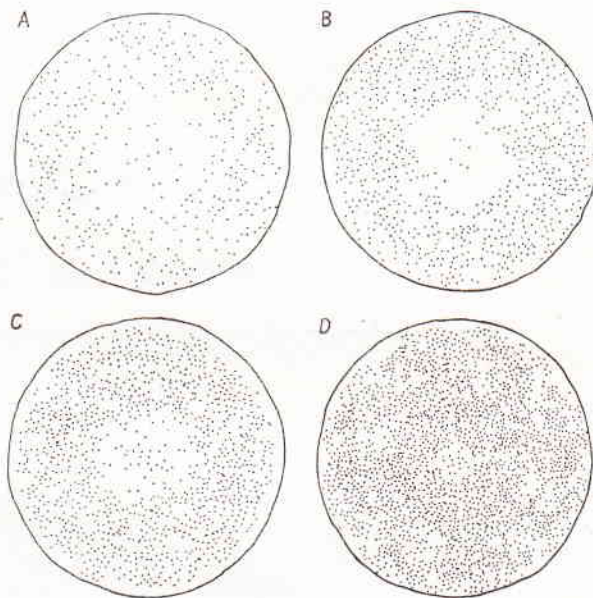
Wymienione barwniki rozcieńczano w różnych proporcjach wodą destylowaną lub buforem fosforanowym (pH 6,6—6,8) oraz stosowano różny czas barwienia: od 5 do 60 minut.

Badanie związku między wielkością „kropek” a liczbą zawartych w nich leukocytów

Z wybranych 300 próbek krwi o znanej liczbie białych krwinek wykonano preparaty szkiełkowe, wybarwiono je i wybrano „kropki” dokładnie o średnicy 1,2, 1,3 i 1,4 mm, wyliczając w nich przy użyciu mikroskopu projekcyjnego Visopan (Reichert, Austria) całkowitą liczbę leukocytów. Na podstawie uzyskanych wartości obliczano osobno dla „kropek” różnej średnicy współczynniki regresji liczby leukocytów w 1 μ l krwi względem liczby tych komórek w „kropce”. Współczynniki te stanowią miarę wzrostu liczby leukocytów w 1 μ l krwi, gdy liczba tych komórek w „kropce” wzrasta o jednostkę.

Adaptacja metody „kropkowej” do szybkiego określania poziomu leukocytów w krwi

Przy użyciu mikroskopu projekcyjnego Visopan (Reichert, Austria) opracowano tablice przedstawiające obraz „kropek” we krwi o różnej zawartości białych krwinek w 1 μ l, w zakresie od 5000 do 30000. Oddzielnie wykonano tablice dla „kropek” o średnicy 1,2, 1,3 i 1,4 mm umieszczając na każdej z nich 12 szkiełków. Tablice te mają charakter wzorca służącego do oceny obserwowanych w mikroskopie preparatów krwi. Wzorce dla 4 wybranych poziomów białych krwinek przedstawia ryc. 1.



Ryc. 1. Komórkowy obraz „kropek” o średnicy 1,3 mm sporządzonych z krwi zawierającej w 1 μ l:

A. 5000 leukocytów, B. 10 000 leukocytów

C. 15 000 leukocytów, D. 20 000 leukocytów

Szkice wykonano ręcznie przy użyciu projekcyjnego mikroskopu Visopan (Reichert, Austria)

Opracowanie nowych zasad wykorzystania metody do diagnostyki opartej na kluczu getyndzkiem

Na podstawie wyżej omówionych współczynników regresji, wyrażających współzależność między liczbą leukocytów w „kropce”, a ich liczbą w 1 μ l krwi nadano nową postać kluczowi getyndzkiemu, nie zmieniając jego merytorycznej treści. Dzięki temu, znając średnicę „kropki” oraz liczbę limfocytów w standardowym pasie o szerokości 47 μ można bezpośrednio przy użyciu zmodyfikowanej tabeli postawić rozpoznanie hematologiczne.

Wyniki

Wpływ różnych czynników na zahamowanie hemolizy preparatów

Stwierdzono, że hamująco na hemolizę działają następujące czynniki:

1. zwiększona objętość nakładanych na szkiełko kropelek krwi,
2. silne suszenie preparatów w pomieszczeniach o podwyższonej temperaturze lub promiennikiem podczerwieni,
3. nadmierna ilość odczynnika zawierającego formalinę w próbkach krwi. Dlatego też wyjątkowo w tej metodzie wskazane jest konserwowanie próbek krwi odczynnikiem sporządzonym wg Tolle i Jahnkego (9), zawierającym niższe stężenie formaliny.

Od nasilenia każdego z wymienionych czynników, a zwłaszcza równoczesnego ich występowania zależy, czy preparat zachowuje zdolność do hemolizy przez kilka godzin czy kilka, a nawet kilkanaście dni. Suszenie świeżych preparatów w temperaturze bliskiej zera, względnie wkładanie ich tuż po sporządzeniu do komory wilgotnej lub do komory zawierającej stężone pary gnojowicy, nie wpłynęło ujemnie na hemolizę preparatów.

Barwienie preparatów

Zadowolające wyniki uzyskano przy użyciu barwnika Giemsy. Roztwór do barwienia przygotowywano dając na 10 ml wody destylowanej 0,2 ml stężonego barwnika Giemsy.

Preparaty były barwione w pozycji pionowej w szklanym naczyniu do barwienia z przykrywką. Czas barwienia wynosił 10—20 minut. Metoda ta szybka i prosta może być używana w zastępstwie bardziej pracochłonnego barwienia sudanem czarnym i błękitem metylenowym. Zaletą barwienia sudanem jest znaczny kontrast między granulocytami a agranulocytami. Barwienie wg Giemsy ten kontrast nieco osłabia, ale ułatwia rozpoznawanie monocytów.

Mniej kontrastowy niż przy użyciu barwnika Giemsy, ale czytelny obraz komórek uzyskano w barwieniu preparatów odczynnikiem May Grünwalda. Roztwór macierzysty tego odczynnika mieszano z równą objętością buforu fosforanowego (pH 6,8) i przeprowadzano barwie-

nie również w naczynkach, w czasie 15—30 minut.

Metoda szybkiego określania liczby leukocytów w 1 μ l krwi

Preparat umieszczano na stoliku mikroskopowym i dobierano takie powiększenie, by można było widzieć w całości „kropkę” o średnicy 1,2—1,4 mm. Obraz mikroskopowy porównywano z wzorcowymi tablicami i subiektywnie określano na tej podstawie liczbę białych krwinek w 1 μ l krwi.

Publikacja ta nie zawiera pełnych tablic. Można je uzyskać u autora.

Uproszczona metoda określania poziomu limfocytów oraz rozpoznawania białaczki

Wartość limfocytów oznaczoną w pasie o szerokości 47 μ wzdłuż średnicy „kropki” należy przeliczyć uwzględniając jej średnicę. Dla uzyskania liczby limfocytów w 1 μ l krwi trzeba tę wartość pomnożyć:

przez 300 przy średnicy 1,2 mm

przez 267 przy średnicy 1,3 mm

przez 248 przy średnicy 1,4 mm

W seryjnych badaniach diagnostycznych lepiej jest zaniechać przeliczania każdego wyniku z osobna i oceniać wprost uzyskane wartości według klucza getyndzkiego w zmodyfikowanej postaci (tab. 1).

Omówienie wyników i ocena użyteczności metody

Praktyczne sprawdzenia metody na terenie zakładów higieny weterynaryjnej, cytowane pozycje piśmiennictwa oraz przedstawione wyniki badań własnych określają w znacznej mierze możliwości wykorzystania omawianej metody. W akcji masowych badań nie może ona konkurować z licznikami elektronicznymi krwinek pod względem dokładności i powtarzalności wyników. Również ocena jakościowa obrazu komórkowego w „kropkach” barwionych sudanem czarnym względnie barwnikiem Giemsy jest trudniejsza niż w rozmazach barwionych metodą Pappenheima. Dotychczasowe doświadczenia ujawniły nadto, że w praktyce rzadko przestrzegane było zalecenia: „końce drutów należy zanurzyć we krwi na głębokość około 1 mm.” Głębsze zanurzenie drutów we krwi po-

Tab. 1. Ocena wartości limfocytów obliczonych na podstawie uproszczonej metody w „kropkach” o średnicy 1,2, 1,3 i 1,4 mm

Wiek zwierząt w latach	Liczba limfocytów w pasie 47 μ standardowych „kropek” o średnicy:								
	1,2 mm			1,3 mm			1,4 mm		
	—	±	+	—	±	+	—	±	+
0—1	<33	33—43	>43	<38	38—49	>49	<40	40—52	>52
1—2	<30	30—40	>40	<34	34—45	>45	<36	36—48	>48
2—3	<25	25—33	>33	<28	28—38	>38	<30	30—40	>40
3—6	<22	22—30	>30	<24	24—34	>34	<26	26—36	>36
> 6	<18	18—25	>25	<21	21—28	>28	<22	22—30	>30

Objaśnienia: zakres prawidłowy, podejrzany i białaczkowy oznaczono symbolami: —, ± i +.

wodowało powiększenie średnicy „kropek”. Na skutek tego zachodzi konieczność uwzględnienia tego czynnika w ocenie uzyskanych wartości. Ocena wielkości „kropek” w polu widzenia mikroskopowego jest bardzo łatwa. Nawet gołym okiem można bez szczególnej trudności określić ich średnicę z dokładnością do 0,1 mm. Tym niemniej konieczność brania pod uwagę tego czynnika zwiększa pracochłonność oznaczeń.

Metoda uproszczona ma jednak pewne szczególne walory. Pozwala ona na zebranie materiału do badań w warunkach, gdzie bezpośrednie dokonywanie badań, zwłaszcza mikroskopowych, jest niemożliwe. Preparaty utrwalone można barwić po upływie paru tygodni, a badania cytologiczne można w tych preparatach przeprowadzać nawet po paru latach. Będąc np. w podróży można w opisany sposób zebrać duży materiał do badań bez zbytniego obciążania się, nanosząc na każde szkiełko nawet po 20 prób krwi.

Metoda ta pozwala również na przechowywanie sprawdzalnej dokumentacji badań hematologicznych. Preparaty „kropkowe” znacznie przewyższają pod tym względem rozmazy krwi, które są mniej przydatne do analizy ilościowej komórek krwi i zajmują znacznie więcej miejsca. Nadto omawiana technika umożliwia bezpośrednią konfrontację wyników badań nawet odległych w czasie.

Preparaty z „kropkami” mogą służyć zarówno do oceny poziomu leukocytów jak i do stwierdzenia bezwzględnej limfocytozy będącej objawem białaczki. Mogą być one również używane do obliczania odsetkowego składu białych krwinek podobnie jak rozmazy krwi.

Modyfikacja zaproponowana przez Szulc (7) może budzić zastrzeżenia. Wyklucza ona bowiem rozpoznanie białaczki u zwierząt wykazujących niższą limfocytozę względną jak 75—80%. Klucz Götze (2) dopuszcza rozpoznanie białaczki już przy poziomie limfocytów 60—65%, a tymczasowa instrukcja zwalczania białaczki w ZSRR (5) ustala tę granicę, w zależności od wieku, na poziomie 50—65%. Modyfikacja Szulc to nie tylko modyfikacja techniki; to również odmienny układ kryteriów rozpoznawczych czyli nowy klucz białaczkowy. A zatem, jak każdy nowy klucz, wymaga on teoretycznej analizy i szerszego sprawdzenia w praktyce.

Dalsze prace nad omawianą metodą mogą spowodować jej ulepszenie. Ideałem byłoby udoskonalenie techniki precyzyjnego nakładania na szkiełko kropelek krwi o standardowej objętości. Wart jest również przeanalizowania wariantu diagnostyki oparty na ocenie liczby leukocytów w całej „kropce” (przy pomocy tablic) i procentu limfocytów określonego w tej samej „kropce”.

Piśmiennictwo

- Balbierz H., Bogatko W., Coglel F.: *Medycyna Wet.* 24, 261, 1968.
- Götze R., Rosenberger G., Ziegenhagen G.: *Mh. Vet.-Med.* 9, 517, 1954.

- Grundboeck M.: *Medycyna Wet.* 23, 116, 1967.
- Kupsch H. R., Mieth K.: *Arch. exp. VetMed.* 24, 1277, 1970.
- Ministerstvo Sel'skogo Chozjajstva SSSR.: *Vremennaja instrukcija o meroprijatijach po bor'be s lejkozom krupnogo rogatogo skota*, Izdatel'stvo „Kolos”, Moskva, 1970.
- Muszynski B.: *Białaczka bydła w gospodarstwach pow. Z.* Praca doktorska. SGGW Warszawa, 1970.
- Szulc A.: *Medycyna Wet.* 23, 612, 1967.
- Szulc A.: *Pol. Arch. wet.* 19, 59, 1976.
- Toile A., Jahnke H. D.: *Zentbl. VetMed. B.* 12, 210, 1965.

Adres autora: prof. dr Marian Grundboeck, ul. 22-Lipca 3 m. 18, 24-100 Puławy.

Грундбек/М. — Оценка и попытки усовершенствования гематологического диагноза лейкоза крупного рогатого скота методом „крапинок”.

Был проверен ускоренный и простой метод обнаружения лимфоцитоза у крупного рогатого скота. Анализировались условия, необходимые для проведения гемолиза препаратов крови. Были составлены таблицы со стандартными „крапинками” различного уровня белых клеток. При помощи этих стандартов можно оценить количество белых клеток. При помощи этого метода были усовершенствованы принципы непосредственного определения лимфоцитоза. Рассматривается возможность применения метода на практике.

Grundboeck M. — Evaluation and attempts to improve the hematological diagnosis of bovine leukosis by means of „Blood spots” method.

A simple and rapid technique to detect lymphocytosis in cattle has been revised and checked. There were analysed the conditions necessary for hemolysis of blood preparations. The technique of staining the blood preparations has been improved. The tables with pictures of standard „spots” representing different leukocyte counts have been prepared. By means of them it is possible to estimate the level of white blood cells. The method of rapid determination of lymphocyte level has been adopted to blood preparations of different size. There were also discussed the possibilities of application of the method.

THEODORIDES V. J., NOWALINSKI T., MURPHY J., FREEMAN J.: Skuteczność albendazolu w leczeniu inwazji nicieni żołądkowo-jelitowych u bydła. (Efficacy of albendazole against gastrointestinal nematodes of cattle). *Amer. J. vet. Res.* 37, 1517—1518, 1976 (12).

Czterdzieści pięć cieląt o wadze 70—110 kg po zakażeniu doustnym larwami zakaźnymi *Trichostrongylus axei*, *Haemonchus contortus*, *Ostertagia ostertagi*, *Trichostrongylus colubriformis*, *Cooperia oncophora*, *Nematodirus spathiger*, *Oesophagostomum radiatum* wypasano przez okres 7 tygodni na pastwisku zanieczyszczonym jajami pasożytów. Następnie cielęta podzielono na 4 grupy. Zwierzęta z grupy 1 otrzymały placebo, z grupy 2 albendazol w dawce 2,5 mg/kg, z grupy 3 ten sam lek w dawce 5,0 mg/kg i z grupy 4 w dawce 10 mg/kg. Albendazol stosowano pod postacią 10% roztworu doustnie. Badania wykazały, że albendazol w dawce 2,5 mg/kg powodował usunięcie conajmniej 99% dojrzałych postaci *T. axei*, *T. colubriformis*, *C. oncophora* i *Bunastomum phlebotomum*, 79% *H. contortus*, 88% *Strongyloides papillosus* i 97% *O. ostertagi*. Po podaniu albendazolu w dawce 5,0 mg/kg conajmniej 95%, zaś po dawce 10 mg/kg conajmniej 97% dojrzałych pasożytów zostało wydalone z organizmu leczonych cieląt. Albendazol w dawce 5 i 10 mg/kg powodował również usunięcie z organizmu 99—100% larw pasożytów. Dojrzałe postacie pasożytów z rodzaju *Trichuris* były słabo wrażliwe na albendazol w stosowanych dawkach.

G.