

I sposobem Castela i naszymi modyfikacjami jesteśmy więc w możności wykazać arsen i jego związki w komórkach i tkankach. Metody te naszym zdaniem, jako mało skomplikowane, dokładne i czyste, nie niszczące struktury komórek i tkanek, odpowiadają wszystkim wymaganiom techniki mikrochemicznej.

Ostatnio M. M. Żelakow w Westnyku Wenerol. i Dermatolog. podaje inne histochemiczne metody wykrywania związków arsenowych w tkankach.

Pierwsza z nich polega na oplukaniu w płynie fizjologicznym cienkich skrawków (0,5—1 mm) i utrwaleniu ich w alkoholu 70%, do którego dodaje się na każde 5 ccm po dwie krople 1% chlorku złota (AuCl_3). Czas utrwalania 12—18 godzin w termostacie w temperaturze 37°C, względnie 48 godzin w temperaturze pokojowej. Następnie alkohole, ksydół, parafina.

Druga metoda Żelakowa polega na utrwaleniu małych wycinków tkanki przeznaczonych do badania w 10 proc. formolu przez kilka lub kilkanaście dni (3—4—30 dni i dłużej), przepłukaniu ich w wodzie bieżącej przez 12—18 godzin i umieszczeniu w termostacie (37 st. C.) na około 10—12 godzin w płynie fizjologicznym, do którego dodaje się na każde 5 ccm po dwie krople 1% roztworu chlorku złota i 1—2 krople kwasu solnego (pH 6—6,5). Następnie alkohole, ksydół i parafina. Wynik: czarne lub czarno-brunatne ziarna wyraźnie widoczne w pierwszorzędnych komórkach układu czynnej mezenchymy.

Wynik: czarne lub czarno-brunatne ziarna wyraźnie widoczne w pierwszorzędnych komórkach układu czynnej mezenchymy.

Chemizmu działania chlorku złota na związki arsenowe (arsenobenzol, salwarsan) Żelakow nie podaje. Prawdopodobnie następuje tu wytworzenie związków kompleksowych salwarsanu z chlorkiem złota (Goldsalwarsan), podobnie jak z miedzią i srebrem. Przy ocenie jednakże wyników otrzymanych metodami Żelakowa nie wolno nam zapominać, że niektóre produkty hydrolizy białka posiadają również zdolność redukowania chlorku złota. Arsen i jego

związki wykazują jednak wyraźnie silne powinowactwo do AuCl_3 i to właśnie upoważniać może do uznania powyższych metod Żelakowa za specyficzne.

STANISŁAW GRZYCKI

HISTOCHEMICAL METHODS OF THE ARSEN TEST IN THE ANIMAL CELLS.

Summary.

Author gives two methods of his own of detecting Arsen and arsen compounds in the cells and tissues.

The first one is the modified Castel Method. This is the procedure:

1. Fix the tissues for testing 3—5 days in 10 percent neutral formalin in aq. dest., to which for every 100 cc — 3.5 g of cuprum bichloratum pur. or copper sulphate is added. It is possible to shorten the fixing time to 24—48 hrs. by fixing in a thermostat in the temp. of 30—37° C.

2. Wash for 24 hrs. in running water then alcohols, xylene, and imbed in paraffin.

3. Microtomic sections, as thin as possible, enclose in the Canada balsam. It is possible to stain the preparation with Mayers hemalum and eosine stain.

4. Result: glittering green grains of arsenocopper compounds in the cells of the tested tissue.

Good results were obtained by the author using another method consisting of fixing the tissue in 80 percent alcohol, to which for every 100 cc — 1 or 1.5 g of cuprum bichloratum pur. or copper sulphate is added. Fixing time — 48 hrs. Alcohols, xylene paraffin. The result: green or yellow-green grains of arsen compounds.

Castel's Method as well as two given above are accurate and sensitive, they do not destroy the cellular and tissue structure, satisfying thus all requirements of the microchemical technique.

Piśmiennictwo

Castel — Bull. d. Histol. Appliq. 13. 1936.

Żelakow — Westn. Wener. Dermatol. 1. 1946.

2. Epizoocjologia i choroby inwazyjne

Laboratoire Central de Recherches Vétérinaire Alfort — France.

J. P. THIERY i C. MAĆKOWIAK

Epizoocja zarazy stadniczej we Francji w latach 1945—46

Epizootic disease „Dourine“ in France in the years 1945 and 1946.

W listopadzie 1945 roku w kilku kantonach departamentu Finistere w Bretanii stwierdzono pierwsze ogniska zarazy stadniczej.

Zarazę stadniczą nie notowano we Francji od wielu lat, gdyż po wojnie od 1914—1918 roku stwierdzono tylko sporadyczne przypadki w Alzacji. Fakt ten

spowodował, że lekarze weterynarii nie byli praktycznie przygotowani do rozpoznawania tej choroby. Dlatego też pierwsze objawy, które najprawdopodobniej ukazały się po okresie kopulacyjnym w 1945 roku, uszły ich uwadze lub były przypisywane otrętom. Dopiero wystąpienie po kilku miesiącach objawów patognomicznych, umożliwiło rozpoznanie kliniczne, które potwierdziły wyniki badań serologicznych.

Netychmiast przeprowadzona ankieta wykazała, że zarazę wprowadziło kilka kłaczy z armii niemieckiej, zarekwirowanych przez miejscowych rolników. Rozmiarów epizootcji nie można było ustalić; stwierdzono tylko, że większa ilość koni objęta jest procesem chronicznym o nietypowym obrazie klinicznym.

Wkrótce po tym rozpoznano nowe ognisko w przeciwniej części kraju, nad granicą szwajcarską, w departamencie Doubs. Odmienny, bardziej typowy obraz kliniczny wskazywał na inne pochodzenie epizootcji, za czym przemawiał również fakt, że w tej okolicy stacjonowały w końcowym okresie wojny wojska francuskie wyekwipowane w Afryce Północnej i posiadające kilka ogierów pochodzenia afrykańskiego. Istniała więc możliwość wprowadzenia przez nich zarazy stadniczej.

Przedsięwzięto energiczne środki walki w celu uniemożliwienia rozszerzenia się epizootcji.

Przed wszystkim zarządziło, że przed wydaniem pozwolenia stanowienia w sezonie kopulacyjnym 1945/46 muszą być zbadane klinicznie i serologicznie kłacze i ogiery w kantonach uznanych za zagrożone. Na terenie całej Francji podobne badanie obowiązywało wszystkie licencjonowane ogiery państwowe i prywatne (około 10.000) jak również wszystkie konie pochodzące z armii niemieckiej. Poza tym wszystkie konie przedstawiające jakikolwiek objaw mogący nasuwać podejrzenie zarazy stadniczej, poddane były badaniu serologicznemu. Wyniki ujemne conajmniej trzech badań wykonanych w odstępach jednego miesiąca, pozwalały uznać zwierzę za zdrowe.

Centralne laboratorium badań weterynaryjnych w Alfort, kierujące powyższą akcją, wydało dla zwierząt uznanych za zdrowe odpowiednie zaświadczenia upoważniające je do kopulacji. Przepisy te zostały wykonane w całości dzięki dużemu uświadomieniu rolników, a przede wszystkim właścicieli ogierów, którzy we własnym interesie wymagali zaświadczeń stwierdzających, że doprowadzone kłacze nie są zakażone. Równocześnie zawiadamiali władze sanitarne o każdym przypadku, który wydawał im się podejrzany.

W wyniku przeprowadzonych badań serologicznych uznano 171 kłaczy i ogierów za dotknięte zarazą stadniczą, a 320 za podejrzane. W następstwie okresowych badań 3 spośród tych ostatnich dało wyniki dodatnie, resztę zaś, po dłuższym okresie obserwacji zwolniono spod kontroli.

Ogólna więc ilość chorych wynosiła 174, przy czym główne ognisko znajdowało się w Bretanii, o wiele mniejsze na granicy szwajcarskiej, a poje-

dyncze tylko przypadki w innych departamentach. W tym ostatnim wypadku chodziło zawsze o zwierzęta, pochodzące z jednego z wyżej wymienionych ognisk albo z armii niemieckiej oraz z Afryki Północnej.

Okazało się, że dane kliniczne nie są stałe, by można było na nich opierać rozpoznanie. Główny ciężar w walce z zarazą stadniczą spada więc na laboratorium, gdyż tylko ono może uskutecznić pewne rozpoznanie choroby i stwierdzić ewentualne wyleczenie zwierzęcia.

Spśród 174 ogierów i kłaczy, uznanych po badaniu serologicznym za zakażone, tylko 20 wykazały typowe objawy zarazy stadniczej, a u 80 stwierdzono lekkie obrzęki w okolicy narządów płciowych, lub tylko zły stan ogólny. Istnienie tych objawów w okręgu objętym zarazą, nasuwało jednak podejrzenie choroby. Reszta zaś zwierząt nie przedstawiała w chwili tego bad. serolog. żadnego objawu. Dopiero po pewnym czasie, najczęściej w kilka miesięcy później, u niektórych z nich wystąpiły objawy potwierdzające słuszność rozpoznania serologicznego. Cyfry te uwidocznione są w tabeli:

	Z objawami		Bez objawów
	typowymi	nietypowymi wychudzenie	
Ogiery	7	14	5
Kłacze	13	67	68
Razem	20	81	73

W klasycznych opisach zarazy stadniczej odróżnia się trzy okresy:

Pierwszy, charakteryzujący się zmianami zapalnymi i obrzękami w okolicy narządów płciowych:

Drugii, w którym przy pogorszeniu się stanu ogólnego, (kulawizna i porażenia miejscowe) ukazują się talerzowate obrzęki na skórze, stanowiące objaw patognomiczny;

Trzeci, cechujący się występowaniem porażen ogólnych i kończący się śmiercią.

W czasie epizootji we Francji nie stwierdzono w znacznej większości przypadków podobnego obrazu. Objawy typowe, występowały rzadko, a jeżeli były stwierdzane, to trudno było zebrać je w grupy odpowiadające jednemu z wymienionych okresów, gdyż, albo występowały razem albo tylko jeden z nich utrzymywał się przez cały czas choroby.

Najczęściej spotykanym objawem było wychudzenie (przeważnie mięśni zadu) zwierząt i niezdolność do większych wysiłków, które stwierdzano przeważnie u kłaczy. Zły stan ogólny przedstawiały tylko trzy ogiery. Łącznie z wychudzeniem występowała dość często kulawizna kończyn tylnych. Chód zwierząt był niepewny, chwiejny, a nagle następowało zgięcie kończyn w stawie pęcinowym i potknięcie się kō-

nia. Zwierzę zginęło często charakterystycznie jedną z tylnych kończyn w stawie pęciny, utrzymując ją w powietrzu przez dłuższy czas, a następnie opierając o ziemię tylko czubkiem kopyta (Fig. 1).

Ze zmian w okolicy narządów płciowych u ogierów stwierdzano twarde, zimne obrzęki worka mosznowe-

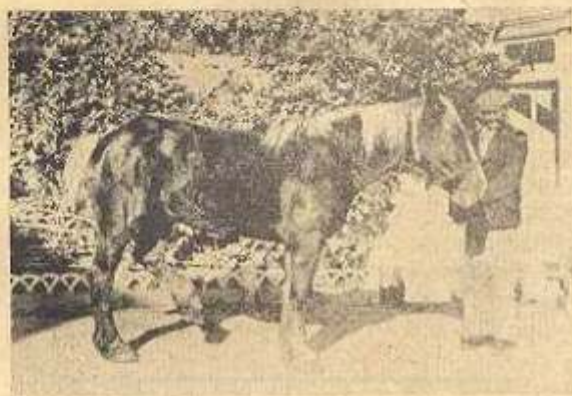


Fig. 1. — Charakterystyczna pozycja lewej tylnej kończyny.

go, niejednokrotnie dochodzące aż na brzuch. Rzadziej i w późniejszym okresie występowały zmiany na prąciu w postaci zapalnych nacieczeń z wybroczynami. Żołądź była w tych przypadkach obrzęknięta i zaczerwieniona (Fig. 2).



Fig. 2. — Zmiany na prąciu.

Kilka razy stwierdzono wymiocowanie na zewnątrz błony śluzowej cewki moczowej, tworzącej na szczycie żołądź polipowate uwypuklenie, silnie pofalowane, obrzęknięte, koloru czerwonego. Objaw ten, aczkolwiek rzadki ma znaczenie ze względu na swą trwałość, podczas gdy wszystkie inne mają na ogół charakter przejściowy.

U klaczy stwierdzano zmiany w pochwie; błona śluzowa była obrzęknięta, zaczerwieniona, zasiana wybroczynami i posiadała ubytki. Obrzęk przechodził na krocze i wymię. Niejednokrotnie, choć znacznie rzadziej, były stwierdzane objawy odmienne, praw-

dopodobnie przedstawiające późniejszy okres rozwoju choroby. Wargi sromowe były w tych przypadkach jakby mniej elastyczne, nieco obwisłe, lekko pofalowane i rozchylone z szaro-białymi plamami w części pigmentowanej. Skóra krocza była silnie pofalowana, a wymię lekko obrzęknięte (Fig. 3).



Fig. 3. — Zmiany na wargach sromowych atrofia mięśni lewej tylnej kończyny.

Obrzęki talarowate na skórze były stwierdzane bardzo rzadko i na ogół nie zwróciły uwagi lekarzy weterynarii. W jednym tylko przypadku były rozsiiane na całej skórze (Fig. 4), w pozostałych zaś



Fig. 4. — Obrzęki talarowate.

stwierdzano jeden lub dwa obrzęki (rzadko więcej) w okolicy mostka, w przestrzeniach międzyżebrowych, lecz najczęściej u nasady ogona. Były one tegie, zimne, wyraźnie ograniczone, przeważnie nie większe od dłoni. Sieć w tych miejscach była zlepiona niewielką ilością surowiczego wysięku.

Z porażek miejscowych zaobserwowano tylko porażenia wargi górnej, która zwisała nieruchomo, nadając głowie konia charakterystyczny wyraz.

Porażenia ogólne stwierdzono tylko w 5 przypadkach, w tym dwa u koni nie leczonych i 3 u leczonych po nawrocie choroby.

Ronień klaczy zarażonych nie notowano i źrebięta odbywały się na ogół normalnie.

Podniecień płciowych nie zaobserwowano.

Stosunkowo często stwierdzano objawy „uboczne”, jak zapalenie oskrzeli połączone z kaszlem, oraz zapalenie zatok i wypływ śluzowo-ropny z nozdrzy.

Trudno było ustalić okres trwania choroby, gdyż większość koni była leczona nowoarsenobenzolem; tym niemniej wśród kilku nieleczonych część padła po wystąpieniu porażenia w końcu roku 1945, czyli prawdopodobnie w 8 do 10 miesięcy po zarażeniu, część natomiast znajduje się jeszcze dotąd pod obserwacją, nie wykazując widocznego pogorszenia stanu ogólnego.

Lagodny naogół przebieg choroby, nietypowość objawów i brak wyraźnego podziału na okresy w obrazie klinicznym pozwolił na ujęcie tej formy zarazy stadniczej, jako postaci europejskiej, w odróżnieniu od postaci afrykańskiej, ciężkiej o typowym przebiegu.

W rozpoznaniu zarazy stadniczej trudno jest, opierać się tylko na danych klinicznych. Laboratorium musi potwierdzić obserwacje kliniczne, gdy to jest możliwe, a równocześnie musi wykryć konie zarażone nie przedstawiające żadnych objawów.

Najpewniejszym sposobem diagnozy laboratoryjnej byłoby niewątpliwie bezpośrednie wykrycie świdrowca w mikroskopowym badaniu płynu obrzękowego lub też w rozmazie ołazywanym przez zeszkrobanie nabłonka błony śluzowej pochwy, lub cewki moczowej, oraz przeszczepienia go na zwierzęta doświadczone.

Niestety w naszych badaniach oba te sposoby zawiodły. Dwa razy tylko zdołano stwierdzić obecność trypanosoma equiperdum u zabitych ogierów, jednak nie udało się próby przeszczepienia na myszy i białe szetry, świnki morskie, króliki i psy, którym zastrzykiwano podskórnie, dootrzewnowo lub dojądrowo znaczne ilości krwi, płynu obrzękowego lub cząstek błony śluzowej. Już zresztą Watson w swych klasycznych pracach nad zarazą stadniczą w Kanadzie stwierdził, że trudno jest wykryć obecność świdrowców u koni zarażonych. Zresztą metody te, bardzo skomplikowane, nie nadają się do masowego badania. Pozostały więc metody serologiczne, polegające na wykryciu przeciwciał specyficznych, wywołanych zakażeniem przez świdrowca.

Stwierdzono, że wiązanie dopełniacza wprowadzone do rozpoznania zarazy stadniczej przez Watsona i konglutynacja według Bordet i Strenga są bardzo dobrymi metodami i pozwalają na przeprowadzenie badań masowych. Oczywiście, że jak w każdej metodzie biologicznej trzeba liczyć się i tu z pewną ilością błędnych wyników. Użycie samego wiązania dopełniacza do diagnostyki, stwarza możliwość otrzymania 2 do 3% błędnych wyników. Równoczesne użycie konglutynacji do kontroli pozwala zmniejszyć tę cyfrę do minimum; doświadczenie wykazało, że nie przekracza ona wtedy 0,5 do 1%.

Ustawodawstwo francuskie nie uwzględniało konieczności wybijania zwierząt dotkniętych zarazą stadniczą. Przewidywało ono zakaz stanowienia, znakowanie zwierząt uznanych za chore i przymusową kastrację ogierów. Na początku epizootcji w 1945 roku wprowadzono dekret, nakazujący przymusowe leczenie wszystkich koni, które posiadały jakikolwiek objaw wskazujący na zarazę stadniczą, przy równoczesnym dodatkowym wyniku odczynu wiązania dopełniacza.

Dobre wyniki osiągnięte przez Ciukę, oraz przez służbę weterynaryjną w koloniach, wskazywały na pomyślne wyniki. Zalecono więc użycie metody Ciuki, polegającej na dożylnym wprowadzeniu nowoarsenobenzolu w dawce 0,04 — 0,045 g. na kilogram żywej wagi; powyższą dawkę powtarza się po 24 godzinach. Poddano leczeniu 130 koni z objawami lub bez objawów klinicznych, jak to wykazuje następująca tabelka:

	Z objawami	bez objawów
Ogierów	18	4
Klaczy	79	29
Razem	97	33

Konie leczone poddane były ścisłej kontroli i podlegały okresowemu badaniu klinicznemu i serologicznemu. U wszystkich stwierdzono wyraźną poprawę ogólnego stanu z wyjątkiem czterech, które wskutek pogorszenia zabito w kilka dni później. Wszelkie objawy ustąpiły po dwóch do czterech miesięcy po zastosowaniu nowoarsenobenzolu i konie mimo normalnej pracy znajdowały się, a niektóre znajdują się jeszcze obecnie, w dobrej kondycji.

Jednak w 8 przypadkach stwierdzono nawrót choroby. Trzy najbardziej typowe obserwacje przytoczam.

Obserwacja Nr 437: Klacz, 520 kg. W listopadzie 1945 roku stwierdzono wychudzenie i lekkie obrzęki, które wkrótce znikły. Wiązanie dopełniacza dało wynik dodatni. W grudniu tegoż roku klacz otrzymała 42 g nowoarsenobenzolu w dwu dawkach. W 2 miesiące później była w doskonałej kondycji, mimo normalnej pracy. W rok po leczeniu objawy wystąpiły na nowo i klacz oddano do rzeźni. Ciekaw-

23.XI.45	11.I.46	15.II.46	21.VII.46	30.XI.46
+++	+++	++	0	+++

wa jest tabelka z wynikami wiązania dopełniacza, gdyż wykazuje, że w pewnym momencie nawet badanie serologiczne dało wynik ujemny.

Obserwacja Nr... Klacz półkrwi; 8 lat; 380 kg. W marcu 1946 roku miała dodatni wynik wiązania dopełniacza, lecz pierwsze objawy wystąpiły dopiero w 2 miesiące później. Wtedy dopiero właściciel zgodził się ją leczyć. Otrzymała 30 g nowoarsenobenzolu 17 i 18 maja 1946 roku. Objawy znikły czasowo, lecz powróciły w październiku tegoż roku. W listopadzie otrzymała raz jeszcze 30 g nowoarsenobenzolu. Wyraźna poprawa wystąpiła do marca 1947 r., po czym nowy nawrót. Wyniki wiązania dopełniacza:

10.III.46	20.V.46	21.VII.46	3.X.46	4.XII.46	1.II.47
+++	+++	+++	+++	0	+++

Obserwacja Nr 1670: Klacz 13 lat, u której stwierdzono objawy klasyczne zarazy stadniczej. Leczona w grudniu 1945 roku znajdowała się w doskonałej kondycji i pracowała normalnie przez 10 miesięcy. W październiku 1946 roku objawy ukazały się na nowo. Leczona raz jeszcze padła w listopadzie tegoż roku. 7 badań serologicznych wykonanych w odstępach 1 do 2 miesięcy dało przez cały czas wyniki dodatnie.

5 pozostałych obserwacji jest podobnych do jednej z powyższych.

Tylko 18 koni spośród leczonych obok poprawy stanu ogólnego wykazało trwale zniknięcie przeciwciał; okresowe badanie serologiczne daje od 10 miesięcy stałe wyniki ujemne. Pozostałe konie mimo dobrej kondycji dawały w badaniach serologicznych (wiązanie dopełniacza, konglutynacja) przez cały okres pozytywne wyniki. W niektórych obserwacjach stwierdzono zniknięcie przeciwciał na 1 do 4 miesięcy, a następnie ukazanie się ich na nowo w surowicy, co wskazuje na niebezpieczeństwo, jakie mogą przedstawiać klacze leczone, jeśli byłby przedwcześnie uznane za wyleczone.

Wyniki leczenia przedstawia poniższa tabelka:

Zwierząt leczonych	Wyleczonych	niewyleczonych		Wyniki niepowodne
		nawrót choroby śmiertelny, ubój	wyleczenie klin. nie serologicznie	
130	18	8	78	26

Cyfry te nie uwzględniają 4 klaczy, które padły lub zostały zabite w kilka dni po wprowadzeniu nowoarsenobenzolu. Ostatnia rubryka „Wyniki niepewne“ obejmuje przede wszystkim ogiery, które po leczeniu były wykastrowane i użyte do pracy; były one badane mniej systematycznie.

Z powyższego wynika, że próby leczenia metodą Ciuki na terenie Francji nie dały spodziewanych wyników. Leczenie kryje w sobie wielkie niebezpieczeństwo, jeżeli pozostawia się konie w rękach właścicieli, jak to miało miejsce na tutejszym terenie. Pozornie dobry stan zdrowia zwierzęcia utrzymuje właściciela w przekonaniu, że zostało ono całkowicie wyleczone i trudno jest niejednokrotnie wytłumaczyć konieczność utrzymania uciążliwej kontroli. Równocześnie właściciele ogierów nie mogą odróżnić tych klaczy od innych, w razie doprowadzenia do staniwienia.

Tak długo jak wiązanie dopełniacza daje wyniki dodatnie, nie można mówić o kompletnej „sterylizacji“ organizmu. Zniknięcie przeciwciał na pewien okres, a następnie ukazanie się ich na nowo może świadczyć o tym, że pewna ilość świdrowców np. w płynie mózgowo-rdzeniowym uniknęła działania nowoarsenobenzolu i po pewnym czasie rozmnożyła się, powodując produkcję nowych przeciwciał. Wszystkie te klacze przedstawiają duże niebezpieczeństwo, jako możliwe źródło rozprzestrzenienia się zarazy.

Przykład Rumunii, gdzie mimo stosowania metody Ciuki od 1920 roku, zaraza stadnicza nie została zlikwidowana, lecz raczej przeciwnie, nasilenie jej zwiększało się, nie przemawia za stosowaniem tej metody. Z drugiej strony Stany Zjednoczone, Kanada, a po pierwszej wojnie światowej i Belgia zlikwidowały definitywnie epizoocję przez zastosowanie metody wybijania wszystkich zwierząt uznanych za zarażone. Ostatnio tę samą metodę przyjęła także Czechosłowacja.

Francuskie ministerstwo rolnictwa, opierając się na powyższym fakcie, wydało ostatecznie następujące zarządzenia: coroczne badanie kliniczne i serologiczne wszystkich ogierów przed sezonem kopulacji. Każdy koń przedstawiający jakikolwiek objaw, który wskazywałby na zarazę stadniczą, jest traktowany jako podejrzany i poddany badaniu serologicznemu. Potrzeba przynajmniej trzech wyników ujemnych wiązania dopełniacza, otrzymanych w odstępach miesięcznych, by uznać zwierzę za niezakażone i zwolnić je spod kontroli. Klacze posiadające objawy zarazy stadniczej i dodatnie wyniki wiązania dopełniacza poddane są ubojowi, ogiery zaś leczone i kastrowane.

We Francji, gdzie ilość zwierząt zarażonych nie była duża, wybijanie zwierząt chorych może okazać się na dłuższą metę mniej kosztowne, niż utrzymywanie stałej i trudnej do wykonania kontroli.

Ponieważ od marca 1946 roku nie stwierdzono ani jednego nowego przypadku zachorowania, można przypuszczać, że epizoocja zarazy stadniczej na terenie Francji została zlikwidowana, tym niemniej wszelkie wydane przepisy będą nadal przestrzegane jeszcze przez dłuższy czas.