

CHOROBY ZAKAŻNE I INWAZYJNE

LECH JAŚKOWSKI

Przeżyciowe barwienie nasienia buhaja w celu różnicowania plemników na żywe i martwe

Zakład Inseminacji i Zwalczenia Bezplodności P. I. W.
Kierownik: dr L. JAŚKOWSKI

Przyżyciowe różnicowanie plemników na żywe i martwe przy pomocy barwienia zastosował Laschley i współpracownicy w r. 1942 używając eozyny jako barwnika różnicującego i błękitu opalu jako czynnika kontrastowego. Schaffer i Almqvist (1948) użyli zamiast błękitu opalu błękit aniliny. Blom (1950) zastosował jako czynnik kontrastowy wodny roztwór nigrozyny. Mayer i współprac. (1951) wykazali, że do barwienia różniczkowego mogą być używane jedynie rozpuszczalne w wodzie halogenne pochodne fluoresceny. Swanson i Bearden (1951), porównali zmodyfikowaną metodę Bloma z metodą Mayera, wykazując, że dają identyczne rezultaty. Morozow (1952) stosuje barwienie samą eozyną, bez czynnika kontrastowego. Metoda Morozowa, jakkolwiek dokładna, jest w praktycznym zastosowaniu nużąca (wyszukiwanie plemników niezabarwionych). Inne wymienione powyżej metody, trudne są u nas do wykonania z powodu braku odpowiednich czynników kontrastowych. W poszukiwaniu za czynnikiem kontrastowym łatwo dostępnym zastosowaliśmy zwykły tusz rysunkowy. Ponieważ wstępne próby dały rezultat pomyślny postanowiono opracować technikę barwienia różniczkowego, przy zastosowaniu tuszu rysunkowego, jako czynnika kontrastowego, oraz zbadać jakie czynniki mogą wpływać niepomysłnie na rezultaty uzyskane tą metodą.

Zastosowana technika barwienia i metodyka pracy

Z prac wymienionych autorów wynika, że zasadniczym postulatem uzyskania wiarogodnych wyników, jest szybkość sporządzenia preparatu. Odnosi się to szczególnie do fazy suszenia preparatu po sporządzeniu rozmazu. Przy powolnym wysychaniu rozmazów istnieje niebezpieczeństwo, że część plemników obumierając po sporządzeniu preparatu ulegnie zabarwieniu, przez nieodwodniony barwnik. W związku z powyższym zastosowano następującą technikę barwienia.

1. Na szkiełku podstawowym umieszczano małą kroplę nasienia (o średnicy około 2 mm), kroplę eozyny (roztwór 1 g eozyny B w 100 ml 3,6% roztworu cytrynianu sodu), oraz kroplę tuszu rysunkowego; krople obu komponentów barwnych miały średnicę około 5 mm.

2. Przy pomocy pałeczki szklanej mieszano nasienie z roztworem eozyny.

3. Krawędzią szkiełka nakrywkowego, przyłożoną do brzegu kropli nasienia z eozyną, oraz kropli tuszu, doprowadzano do zlania się obu kropli, po czym natychmiast, nieodrywając szkiełka podstawowego Nr 2, sporządzano cienki rozmaz. (Przy sporządzaniu rozmazu posługiwano się techniką używaną do sporządzania rozmazów z krwi).

4. Natychmiast po sporządzeniu rozmazu, umieszczano preparat w strumieniu gorącego powietrza, w celu szybkiego wysuszenia preparatu.

W każdym preparacie obliczano stosunek barwny: niebarwny tysiąca plemników. Wyniki porównywano z rezultatem obliczenia plemników martwych w na-

sieniu niezabitym, przy pomocy metody opisanej przez Jaśkowskiego (1951).

Każde doświadczenie powtórzono z 10 ejakulatami.

Badaniu poddano nasienie nierozcieńczone i rozcieńczone rozcieńczalnikiem żółtkowo-cytranianowym.

W celu sprawdzenia wpływu techniki barwienia na wiarogodność wyników sprawdzono następujące odmiany techniki sporządzania preparatów:

1. Krótkie barwienie eozyną (około 3''), krótkie działanie tuszu (około 3'') i krótkie suszenie (około 5''). Wszystkie czynności związane ze sporządzeniem preparatu trwały około 10—15'.

2. Barwienie eozyną około 30'', pozostałe czynności jak w p. 1.

3. Barwienie eozyną około 3 min. pozostałe czynności jak w p. 1.

4. Barwienie eozyną około 5 sek., przetrzymanie w tuszu 1 minutę.

5. Barwienie eozyną około 5 sek., przetrzymanie w tuszu 2 minuty.

6. Barwienie eozyną około 5 sek., przetrzymanie w tuszu 3 minuty.

Opisana technika różni się o tyle od techniki stosowanej przez innych autorów (nie biorąc pod uwagę różnicy w stosowanym czynniku kontrastowym), że wymienieni powyżej autorzy nie sporządzali rozmazów po zmieszaniu nasienia z barwikami, lecz preparaty odciskowe.

Wyniki

Zastosowana metoda pozwalała na wyraźne rozpoznanie plemników zabarwionych i niezabarwionych. W preparatach z nasienia rozcieńczonego obserwowano nierównomierne rozłożenie tuszu (skutki obecności ciał tłuszczowatych), wskutek czego powstawały pola jasne i ciemne. Obserwacja plemników była łatwiejsza w obrębie pól jasnych. Plemniki zabarwione (uważane za martwe) wykazywały różne stopnie różowego zabarwienia główki, a mianowicie: a) jednolite jasnoczerwone wybarwienie główki, b) różowe zabarwienie akrosomu i jasnoczerwone jądra (półbarwne), c) jednolite różowe zabarwienie całej główki (różowe), d) brak wybarwienia akrosomu i różowe zabarwienie jądra (półróżowe).

W tablicy Nr 1 przedstawiono wyniki doświadczeń z 10 ejakulatami, przy zastosowaniu różnych technik barwienia. (Przy zastosowaniu dwu pierwszych technik, rezultaty uzyskane metodą barwienia różniczkowego różnią się bardzo nieznacznie od rezultatów uzyskanych przy pomocy metody obliczania odsetka plemników martwych w nasieniu niezabitym. Mianowicie obliczenie w hemocytometrze, wykazało że w badanych 10-ciu ejakulatach było przeciętnie 38% martwych plemników, obie pierwsze techniki wykazały obecność 35,9 lub 39,9% plemników zabarwionych. Trzyminutowe barwienie eozyną zwiększa odse-

tek zabarwionych plemników, prawdopodobnie na skutek obumierania plemników spowodowanego działaniem 3-eh szkodliwych czynników dla nasienia: a) rozcieńczenia w roztworze wodnym cytrynianu sodu, b) wysychania i zmiany ciśnienia osmotycznego oraz c) działania samej eozyny.

Działanie tuszu, jak wynika z doświadczenia (technika 4—6) jest bezwzględnie szkodliwe dla plemników i w bardzo krótkim czasie prowadzi do obumarcia i zabarwienia plemników.

Tablica Nr 1. Porównanie wyników barwienia różniczkowego z wynikiem obliczenia plemników martwych w nasieniu niezabitym, przy zastosowaniu różnej techniki sporządzania preparatów (na 1000 plemników)

L. P.	Technika barwienia	Ilość plemników z wybarwionych						Odsetek zabarwionych A	Odsetek plemn. nieruch. w nas. zabitym B	Różnica między A i B
		1 sek. tuszem	2 sek. tuszem	3 sek. tuszem	1 min. tuszem	2 min. tuszem	3 min. tuszem			
1.	3 sek. tuszem	41	102	36	100	375	35,9	38	- 2,1	
2.	30 sek. tuszem	45	306	40	108	559	55,9	38	+ 17,9	
3.	3 min. tuszem	54	250	70	210	682	68,2	38	+27,2	
4.	3 sek. tuszem	101	334	68	301	804	80,4	38	+42,4	
5.	3 min. tuszem	105	475	55	222	855	85,5	38	+47,5	
6.	3 min. tuszem	51	475	63	270	859	85,9	38	+47,9	

Zastosowanie barwienia różniczkowego do określenia plemników martwych w nasieniu rozrzedzonym rozcieńczalnikiem żółtkowo-cytrynianowym, wykazało w pierwszym rzędzie właściwości ochronne rozcieńczalnika żółtkowego. Mianowicie stwierdzono, iż w nasieniu rozcieńczonym z tego samego ejakulatu było wybarwionych (martwych) plemników o 40% mniej niż w nasieniu nierozcieńczonym. Obliczenie plemników nieruchomych w nasieniu niezabitym wykazało różnicę między nasieniem nierozcieńczonym a rozcieńczonym 35%. W zastosowaniu do nasienia rozrzedzonego, konserwowanego, metoda barwienia różniczkowego dała rezultaty przedstawione w tab. 2.

Tablica Nr 2. Rezultaty barwienia różniczkowego nasienia rozrzedzonego, konserwowanego przez 10 dni w temp. +10° w porównaniu z odsetkiem plemników martwych w nasieniu niezabitym (przeciętnie 6 ejakulat)

1. Odsetek plemn. z ruchem progresywnym	Nasienie świeże	Po konserwacji przez				
		2 dni	4 dni	6 dni	8 dni	10 dni
2. Odsetek plemn. ruchliwych	61,0	47,0	26,0	22,0	19,0	15,0
3. Odsetek plemn. niezabitych	75,0	66,0	50,0	41,0	32,0	26,0
Różnica między 3 a 2	81,4	55,2	52,0	41,0	39,6	39,6
Różnica między 1 a 2	+ 14,0	- 0,8	+ 21,0	0,0	+ 7,6	+13,6
Różnica między 3 a 1	+20,4	+18,8	+26,0	+19,0	+20,6	+24,6

Z tabl. 2 wynika, że do 6-go dnia konserwacji barwienie różniczkowe daje dość zgodne rezultaty z obli-

czaniem plemników martwych w nasieniu niezabitym. W nasieniu starszym odsetek plemników nieruchomych jest wyższy aniżeli odsetek plemników zabarwionych, przy czym różnica ta wzrasta w miarę starzenia się nasienia. To zjawisko tłumaczymy sobie uszkodzeniem aparatu ruchowego u plemników na skutek działania produktów przemiany materii w nasieniu starym; w związku z tym znajduje się w nim wiele plemników jeszcze żywych (nie barwiących się) ale nieruchomych.

Posługując się metodą barwienia różniczkowego można z dość dużą ścisłością określić odsetek plemników o ruchu progresywnym, pod warunkiem, iż obecność ruchu progresywnego sprawdzi się przez bezpośrednie oglądanie nasienia niezabitego. Mianowicie jak wynika z tabl. 2-giej, odsetek plemników o ruchu progresywnym jest przeciętnie niższy o 21 jednostek procentowych aniżeli odsetek plemników niezabarwionych (żywych).

Omówienie wyników

Rezultaty naszych badań przy zastosowaniu krótkiego barwienia 1% roztworem eozyny i bardzo krótkiego stykania się nasienia niewysuszonego z tuszem rysunkowym, są zgodne z wynikami autorów wymienionych na wstępie. W związku z powyższym do praktycznego zastosowania nadawałaby się najlepiej następująca technika barwienia: barwienie 1% roztworem eozyny przez 5—30 sekund; zmieszanie z tuszem i szybkie sporządzenie cienkiego rozmazu (czas trwania tej czynności nie dłużej niż 5 sek.); wysuszenie preparatu w prądzie gorącego powietrza (w ciągu 3—5 sekund).

Zagadnienie uzyskania obiektywnej metody dla określenia ilości martwych plemników w nasieniu ma duże znaczenie zarówno teoretyczne jak praktyczne. Metoda szacunkowa, stosowana najczęściej w praktyce inseminacyjnej, jest zbyt subiektywna i naraża na duży błąd. Liczenie martwych plemników w niezabitym nasieniu przy pomocy cytometru, wymaga dużych rozcieńczeń nasienia, szkodliwych dla plemników. Ścisłość jej w dużym stopniu zależy od technicznego opanowania metody. Barwienie różniczkowe, jak wynika z naszych badań, nie wiele odbiega, jeżeli chodzi o wyniki, od metody poprzedniej, ma jednak tę przewagę iż nie wymaga specjalnych urządzeń (komory ogrzewającej) oraz że obliczanie wybarwionych plemników można przeprowadzać w wiele godzin po sporządzeniu preparatu. Sołowiej i Kuzniecowa (1952) zastosowali metodę Morozowa do badań nad zmianami w plemnikach w przebiegu konserwacji, podkreślając jej dużą wartość

CZESŁAW KUREK

Indeks opsonocytofagocytarny świnek morskich szczepionych Br. S19

Państwowy Instytut Wet. w Puławach, Wydział Mikrobiologii
Kierownik: Doc. dr ALFRED CHODKOWSKI

Od czasów Wrighta i Douglasa (1903, 1904) znany termostabilne opsoniny, obecne w normalnej surowicy krwi. Neufeld i Rimpau (1904, 1905) opisały bakteriotropin, przeciwciała termostabilne i spe-

cyficzne, występujące w surowicy zwierząt uodpornianych. Huddleson (1933), zaproponował mierzenie ilości bakteriotropin za pomocą fagocytozy dla celów diagnostycznych brucellozy, nazywając próbę indeksem