

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	632	63,2	38	+25,2	
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	2. Odsetek plemn. ruchliwych	3. Odsetek plemn. niezabitych	Nasienie świeże					Po konserwacji przez						
			Świeże	2 dni	4 dni	6 dni	8 dni	10 dni	Świeże	2 dni	4 dni	6 dni	8 dni	10 dni
61,0	75,0	81,4	61,0	55,2	47,0	26,0	22,0	19,0	15,0					
			+ 5,4	- 9,8	- 14,0	0,0	+ 7,6	+ 12,6						
			+20,4	+16,8	+36,0	+18,0	+30,6	+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 starzym; 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 świńek 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 bakteriotropiny, 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

opsonocytofagocytarnym (ocf). Pojęcie opsonocytofagii wprowadzili Shattock i Dudgeon (1908 cyt. wg Huddlesona) 2) używając do próby świeżej krwi z dodatkiem cytryn. sodu. Van der Hoeden (1940, 1941) i Jersild (1941 cyt. wg Renoux i Simonnet 6) zastąpili krew świeżą surowicą inaktywowaną, określając próbą jako „tropin test.” Renoux i Simonnet (6) stosowali technikę Van der Hoedena i Jersilda w diagnostyce brucellozy, podkreślając dużą specyficzność i czułość próby. Autorzy nazwali próbę indeksem bakteriotropinowym. Rossi i Dutilloy (7) przy użyciu podobnej techniki badali poziom bakteriotropin surowicy krwi i serwatki mleka zwierząt zakażonych brucellozą, wysnuwając wnioski analogiczne jak Renoux i Simonnet. Autorzy ci kierowali się innymi kryteriami oceny fagocytozy, aniżeli Huddleson (2), który za pomocą indeksu ocf określał stan immunologiczny organizmu przy brucellozie tzn. stwierdzał jego wrażliwość wzgl. odporność. Rabstein i Cotten (5) określali za pomocą indeksu ocf odporność bydła szczepionego S 19. Wg Huddlesona można w ten sposób określić antygenową wartość szczepionki.

Założeniem niniejszej pracy było stwierdzenie, jak przebiega indeks ocf świnek morskich szczepionych S 19 jednorazowo wzgl. kilkakrotnie, przy uwzględnieniu odczynu Wrighta.

### Materiał i metody

Do próby użyto świnek morskich szczepionych i nie szczepionych S 19. Na przestrzeni 2 lat świnki morskie szczepiono podskórnie 1—3 razy 1 ml Brucella S 19; zawiesina bakterii zawierała w 1 ml  $18.10^9$  drobnoustrojów. Technikę indeksu ocf stosowano wg Huddlesona (2) przy użyciu zawiesiny bakteryjnej w postaci świeżego szczepu S 19 zawierającego  $18.10^9$  żywych bakterii w 1 ml. Barwiono błękitem toluidynowym wg Calmette'a Negre'a i Boquet'a (2). Liczono 25 leukocytów obojętnochłonnych, oznaczając w poszczególnych komórkach sfagocytowane bakterie i zależnie od ich ilości klasyfikowano neutrofile jako:

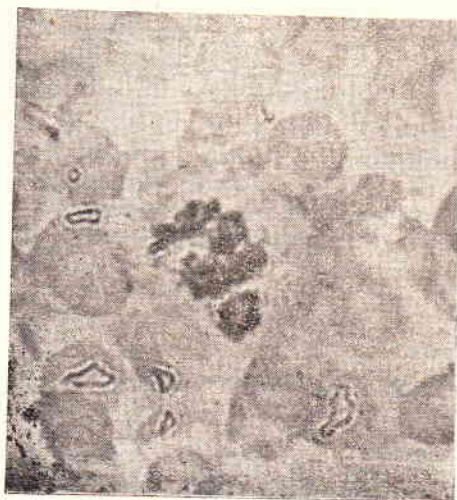
- ujemne — przy braku fagocytozy,
  - ślabo dodatnie — 1—20 bakterii sfagocytowanych,
  - średnio dodatnie — 21—40 bakterii sfagocytowanych,
  - silnie dodatnie — 41 i więcej bakterii sfagocytowanych,
- 60% neutrofilów silnie dodatnich kwalifikowało zwierzę jako odporne. Próbę oceniano łącznie z odczynem Wrighta.



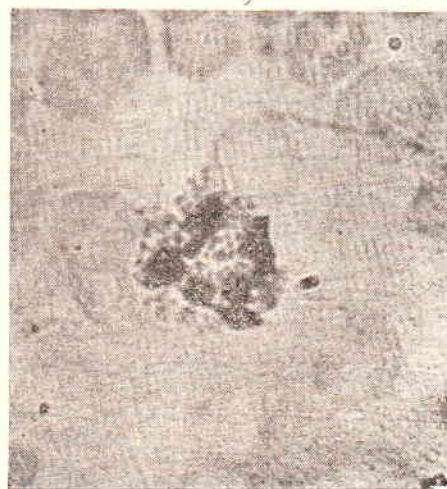
1



2



3



4

zdj. 1 — brak fagocytozy  
zdj. 2 — fagocytoza sł. dodat.

Zdjęcia org. Pacewicz PIW.  
zdj. 3 — fagocytoza średn. dodat.  
zdj. 4 — fagocytoza sil. dod.

Świnki morskie badano w 3 grupach określając odczyn Wrighta i wysokość indeksu ocf. Wyniki ilustrują tablice 1, 2.

Tablica 1\*)

Częstość szczepień S 19, wysokość miana aglutynacyjnego i siła ocf krwi świnek morskich szczepionych kilkakrotnie i jednorazowo.

Nr. świnki	Data szczep. S 19	Majwyższe miano po szczepien.	Wysokość miana po szczepien.	Indeks opsonocytofagocyтары			
				silnie dodat.	średn. dodat.	slabo dodat.	ujemny
1	9.3.49	400	25	-	-	-	-
	19.10.49	1500	100	23	2	-	-
	24.1.51	800	100	-	-	-	-
2	23.5.49	400	-	-	-	-	-
	24.1.51	200	50	15	8	-	1
3	5.8.49	400	-	30	1	2	2
	24.1.51	1500	100	-	-	-	-
4	2.5.50	800	50	-	-	-	-
	24.1.51	300	400	15	3	4	3
5	24.12.50	100	-	-	-	-	-
	24.1.51	400	25	4	3	4	14
6	21.12.50	400	-	-	-	-	-
	24.1.51	500	100	12	6	2	3
7	20.10.51	400	30	-	-	-	-
	24.1.51	1600	100	15	6	3	-
8	2.10.50	400	100	-	-	-	-
	24.1.51	800	50	16	7	2	-
9	5.7.51	400	50	15	9	1	-
	24.1.51	400	50	13	7	4	1
10	24.1.51	400	100	13	6	3	3
	2.2.51	800	-	25	-	-	-
11	3.2.51	200	25	23	2	-	-
	3.2.51	200	25	23	2	-	-

Tablica 2

Wysokość miana aglutynacyjnego i siła ocf krwi świnek morskich badanych w 23 dni po szczepieniu S 19 i wyniki grupy kontrolnej

Nr. świnki	Miano aglutynacyjne	Indeks opsonocytofagocyтары			
		sil. dodat.	średn. dodat.	slabo dodat.	ujemny
1	200	23	3	-	-
2	400	22	3	-	-
3	400	24	1	-	-
4	400	13	6	-	-
5	400	21	4	-	-
6	100	21	4	-	-
7	200	20	5	-	-
8	100	21	4	-	-
9	200	23	2	-	-
10	400	24	1	-	-
Grupa kontrolna					
1	-	-	1	-	24
2	-	-	-	-	22
3	-	-	-	-	17
4	-	-	-	-	20
5	-	-	-	-	15
6	-	-	-	-	23
7	-	-	-	-	22
8	-	-	-	-	22

Dyskusja

Wyniki przedstawione w tablicy Nr 1 wskazują, że indeks ocf w 9 przypadkach na 13 badanych został oceniony jako silnie dodatni, gdyż minimum 60% neutrofilów obojętnochłonnych wykazało fagocytozę silnie dodatnią. Znamionym jest fakt, że wysokość miana aglutynacyjnego nie wpływała na stopień żerności leukocytów. Świnka morska Nr 12 o ujemnym mianie aglutynacyjnym miała 100% neutrofilów silnie dodatnich. Wyniki w grupie doświadczalnej otrzymano bardziej jednorodnie, niż w grupie pierwszej w której indeks ocf nie osiągnął we wszystkich przypadkach wysokości świadczącej o odporności.

Kilkakrotne szczepienia nie wpłynęły na zwiększenie poziomu bakteriotropin. Jednolitość wyników gru-

py doświadczalnej w postaci silnie dodatnich wyników ocf należy zawdzięczać niewątpliwie krótkiemu okresowi czasu, jaki upłynął pomiędzy datą szczepienia zwierząt, a datą wykonania indeksu (23 dni). Grupa kontrolna wykazywała ujemny odczyn Wrighta i zupełny brak zdolności fagocytowania bakterii *in vitro*. Nieliczne neutrofile słabo dodatnie, zawierały w swej plaźmie nie więcej jak 1—5 bakterii.

Obszerne studia nad zastosowaniem indeksu ocf w diagnostyce brucellozy przeprowadzili badacze amerykańscy i francuscy. Rabstein i Cotten (5) przeprowadzili badania nad przydatnością tej metody w określaniu stopnia odporności bydła szczepionego S 19. Autorzy ci stwierdzili, że reakcja poszczepienna występowała bardzo szybko, a ilość bakteriotropin utrzymywała się na wysokim poziomie 4 lata po szczepieniu. Po 7 latach indeks ocf krów szczepionych nie różnił się od indeksu krów nieszczepionych. Huddleson (2) przeprowadzał badania na obszernym klinicznym materiale ludzkim i stwierdził, że u osobników zakażonych brucellozą przy wyraźnych objawach klinicznych indeks ocf był niski. Odwrotnie było przy łagodnym przebiegu klinicznym choroby. Dalszym spostrzeżeniem był fakt występowania wybitnej fagocytozy u ozdrowieńców. Pewne zastrzeżenia co do użyteczności tej metody wysunęli Evans, Morales-Otero, Gonzales (1). Autorzy francuscy Renoux, Simonnet (6) i Rossi, Dutilloy (7) są zgodni w wynikach, stosując indeks w modyfikacji Van der Hoedena i Jersilda (1940—41) cyt. wg Renoux i Simonnet (7). Indeks ocf stosują oni jako czynnik pomocniczy w diagnostyce brucellozy, traktując go jako moment rozpoznawczy, a nie rokujący o przebiegu procesów immunologicznych zakażonego organizmu.

W brucellozie zaznacza się fazowość odczynów serologicznych, co wyraźnie widać na przykładzie świnek morskich szczepionych S 19. Okres utrzymywania się miana aglutynacyjnego poszczepiennego u bydła określany jest na 1/2—1 roku (3). Po tym czasie indeks ocf może mieć praktyczne zastosowanie w określeniu aktualnego stanu organizmu, który zetknął się z pałeczką roniczenia albo był poddany szczepieniu, tym bardziej, że zwierzęta pozostają odporne dłuższy okres czasu aniżeli to wykazuje poziom aglutynin we krwi (5). Huddleson proponuje w związku z tym oceniać stan odpornościowy organizmu w stosunku do pałeczek roniczenia na podstawie zespołu prób i badań wg schematu tablicy Nr 3.

Odczyn Wrighta	Odczyn Burneta	Indeks ocf	Ocena stanu aktualnego organizmu
-	-	0—20% neutrofilów słabo dodatnich	wrażliwy
-	+	0—40% neutrofilów silnie dodat.	zakażony?
+	+	0—40% neutrofilów silnie dodat.	zakażony
+	+	60—100% neutrofilów silnie dodatnich	odporny

\*) Wyniki odczynów Wrighta otrzymałem od Dr A. Teklińskiego.

## Wnioski

1. Indeks ocf świnek morskich szczepionych Brucella S 19 jest silnie dodatni, co wg Huddlesona pozwala je kwalifikować jako odporne przeciwko brucellozie.

2. Szczepienia kilkakrotne nie zwiększają poziomu bakteriotropin.

3. Nie ma korelacji między mianem aglutynacyjnym, a poziomem bakteriotropin we krwi.

4. Wyniki badań indeksu ocf były bardziej jednorodne, gdy wykonano je krótko po szczepieniu.

5. Indeks ocf świnek kontrolnych był ujemny.

## Piśmiennictwo

1. Gradwohl: Clinical Laboratory Methods and diagnosis (1948) t. II s. 1483. 2. Huddleson F.: Brucellosis in Man and Animals (1943). 3. Jakubowski S.: Medycyna Wet. 1949) nr 7 s. 498. 4. Kolle-Kraus-Uhlenhut: Handbuch der pathogenen Mikroorganismen (1929) t. II, cz. 2. 5. Rabstein Melvin. M. Cornelia Cotten.: Bang's disease immunity tests and a new vaccination method. (1914) Maryland. 6. Renoux G., Simonnet G.: (1951) La semaine des hopitaux 27<sup>e</sup> année n. 8 p. 341. 7. Rossi P., Dutilloy Y.: (1951) Bull. de L'Academie Vet. de France n. 6. 8. Żebrowski Leon.: Konsultacje osobiste.

A. KAMIŃSKA, Z. LARSKI, M. PROKOPECZKO

## Poziom przeciwciał dla *Br. abortus bovis* w surowicy kur na terenie woj. opolskiego

Wojewódzki Zakład Higieny Weterynaryjnej w Opolu  
Kierownik: dr ANNA KAMIŃSKA

Brucelloza kur jako taka nie stanowi ważnego problemu gospodarczego, gdyż straty wywołane przez to schorzenie są bardzo małe. Przebiega najczęściej w postaci bezobjawowej, a tylko w rzadkich wypadkach występują objawy kliniczne jak utrata apetytu, zmniejszenie nośności, osłabienie, zapalenie stawów, biegunka, anemia i porażenia, które w pewnej ilości przypadków po około 2—3 miesiącach prowadzą do zejścia śmiertelnego.

Z epizootologicznego i epidemiologicznego punktu widzenia brucelloza kur jest problemem ważnym, na który zwraca ostatnio uwagę cały szereg autorów. Zakażona kura może być siewcą zarazków, które wydostają się z wydalinami zakażając wodę, glebę, paszę dla zwierząt, produkty spożywcze itd. Według Sopikowa i Ciro brucelle mogą lokalizować się w pęcherzykach żółtkowych zakażonych kur oraz w jajach przez nie złożonych, w których zarazki zachowują swą zjadliwość ponad jeden miesiąc, a więc spożycie takich jaj stanowi niebezpieczeństwo dla człowieka.

Eliminacja kur zakażonych z hodowli jest możliwa do przeprowadzenia przy zastosowaniu laboratoryjnych metod wykrywania nosicieli. Diagnostyka bakteriologiczna jednak praktycznie nie może wchodzić w rachubę, gdyż nie nadaje się do badań masowych, a poza tym wyosobnienie brucelli u kur jest stosunkowo trudne. Ptaki te bowiem na ogół łatwo traca zarazki, niekiedy już po 6—30 dniach, a w rzadkich tylko przypadkach pozostają nosicielami i siewcami do 75 dni (Pankratow). Natomiast badania serologiczne i alergiczne pozwalają na przebadanie w krótkim czasie dużej ilości ptaków.

Badanie serologiczne przeprowadzone w różnych krajach dały następujące wyniki (cyt. wg Swincowa — Bolezni Ptac 1951). Kuricka (1936) przy badaniu krwi 1104 kur stwierdziła u około 1% odczyn aglutynacji w mianie 1:50 do 1:200, Pankratow badając 384 kury z rejonu, w którym panowała brucelloza bydła, stwierdził tylko u 4-ch sztuk dodatni odczyn serologiczny. We Francji wg danych

Dubois'a w niektórych fermach ilość kur reagujących dodatnio dochodziła do 60%, we Włoszech wg Florentiniego 55%. W USA Emmeli i Huddleson stwierdzili u 16,5% badanych kur miano dodatnie. Wyniki podane przez ostatnich badaczy zostały potwierdzone w badaniach McNutta, Purwina oraz Roekela.

Brak dotychczas danych odnośnie procentu reagujących kur na terenie Polski. Badania takie przeprowadzał w kilku fermach woj. wrocławskiego Anczykowski (1950), nie podał jednak dotychczas szczegółowych wyników. Odnośnie wysokości miana aglutynacyjnego, świadczącego o zakażeniu, Beller i Stockmayer (1952) ustalają je na 1:150 do 1:200, większość jednak autorów przyjmuje za dodatnie miano 1:20 do 1:25. Niekiedy stwierdza się miano wysokie do 1:600, a nawet 1:10.000 (najwyższe dotychczas stwierdzone miano — Swincow).

### Badania własne

Przebadaliśmy ogółem 3.045 kur z terenu woj. opolskiego metodą aglutynacji próbówkowej przy zastosowaniu instrukcji P. I. W., obowiązującej przy badaniu w kierunku brucellozy bydła, poczynając od rozcieńczenia 1:12,5. Krew pochodziła z terenu 8 powiatów woj. opolskiego od kur stanowiących 13 ferm P.G.R. i Spółdzielni Produkcyjnych oraz 10 właścicieli prywatnych.

Przyjmując krew do badania zbieraliśmy w każdym przypadku dokładną anamnezę dla zorientowania się w warunkach epizootologicznych, zwracając głównie uwagę na następujące momenty: odległość fermy od najbliższej obory, stan obory (zakażona lub nie), czy personel majątku pracuje również na fermie oraz czy mleko pobiera ferma wprost z majątku czy z mleczarni. Ponadto pytaliśmy, czy wśród kur były wypadki pasterellozy. Surowica bowiem kur chorych na pasterellozę posiada własność nieswoistego aglutynowania brucelli nawet w wysokich rozcieńczeniach (Swincow). W dostępnej literaturze nie znaleźli-