

oznaczania miedzi można przeprowadzać przez:

1. spalanie surowicy na sucho
2. mineralizację składników surowicy za pomocą stężonych kwasów utleniających
3. przeprowadzenie miedzi do roztworu z jednocześnie odbiałaniem surowicy za pomocą HCl i CCl_3COOH .

Ad 1. W celu spalania próbki na sucho pobiera się do tygielka 0,5 ml surowicy, odparowuje się nad grzejnikiem elektr. do momentu rozpoczęcia zwęglania i praży w piecu w temp. nie wyższej niż 55° . W trakcie spalania zwilża się (po ostudzeniu) zawartość tygla kilkoma kroplami stęż. HNO_3 i odparowuje do sucha. Składniki popiołu przeprowadza się w chlorku przez potraktowanie pozostałości w tygliku kilkoma kroplami HCl (1:1) i odparowanie. Zawartość tygla rozpuszcza się w 3 ml 2 m HCl i zachowuje do dalszego toku analizy.

Ad. 2. Mineralizację na mokro przeprowadza się przez ogrzewanie 0,5 ml surowicy z 2 ml stęż. HNO_3 i 2 ml 60% HClO_4 w 50 ml kolbkach Kjeldahla. Aby zapobiec przegrzewaniu się roztworu do kolbki wrzuca się 2–3 szklane kulki. Zawartość w kolbkach ogrzewa się na młym ogniu do momentu odbarwienia, potem silniej przez ok. 15 min. Po ostudzeniu roztwór przenosi się ilościowo do tygla o poj. 20–25 ml i odparowuje do sucha nad grzejnikiem elektr. Pozostałość zwilża się kilkoma kroplami HCl (1:1), ponownie odparowuje i rozpuszcza w ml 2m HCl .

Ad. 3. Uwolnienie miedzi z kompleksów białkowych przeprowadzić można przez potraktowanie surowicy HCl i CCl_3COOH . W tym celu do 1,0 ml surowicy, umieszczonej w probówce wirówkowej, dodaje się 1,5 ml 2m HCl i po wymieszaniu pozostawia na 10 min. Po upływie tego czasu dodaje się w trakcie dokładnego mieszania roztworu 1,5 ml 20% kw. tróchlorooctowego i pozostawia na dalsze 10 min. Wytrąceny osad odwirowuje się przy 3000 obr./min. Do dalszego znaczenia pobiera się 3 ml roztworu znad osadu.

Przebieg analizy. Do probówki wirówkowej pobiera się 3 ml przygotowanego jak wyżej roztworu, dodaje 0,3 ml nasyconego wodnego roztworu oksalilo-dwuhydrazdu (ok. 0,2%), 2 ml cytrynianu amonu (o pH=9, doprowadzone za pomocą stęż. NH_3 wobec uniwersalnego papierka wskaźnikowego), a po wymieszaniu kolejno: 0,3 ml nasyconego wodnego roztworu pirofosforanu sodu, 2 ml 8% roztworu NH_3 i 1 ml 40% wodnego roztworu aldehydu octowego (aldehyd należy dodawać zawsze w ostatniej kolej-

ności). Zawartość probówki miesza się i jeśli próbkę surowicy przygotowywano wg pkt. 3, po upływie 30 min. dokonuje się pomiaru spektrofotometrycznego. Jeżeli próbka surowicy była mineralizowana, po 30 min dodaje się jedną kroplę roztworu szkła wodnego (1:5), a po wymieszaniu i 10 min. wirowaniu przy 3 tys. obr./min., dokonuje się pomiaru ekstynkcji. Wytworzone czerwono-fioletowe zabarwienie próbki nie zmienia swojej intensywności w temp. pokojowej co najmniej przez 24 godz.

Jednocześnie z próbami badanymi przeprowadza się oznaczenie w próbie kontrolnej, przygotowanej wg tego samego sposobu i z dokładnie takimi samymi ilościami odczynników, jak przy próbie właściwej. Wyniki odczytuje się z krzywej standardów sporządzonej uprzednio w zakresie 0–5 γ Cu. Parametry pomiaru: $\lambda = 542 \text{ nm}$ (na fotometrze Pulfricha S-53), $d = 20 \text{ mm}$.

Wnioski

1. Opracowana metoda przewyższa czułością i specyficznością spektrofotometryczne metody oznaczania miedzi oparte na pomiarze kompleksu z dwutytlo-dwutio-karbaminianem sodu.

2. Zmniejszenie objętości próby do 0,5–1 ml, czyni metodę przydatną w badaniach miedzi w surowicy u ludzi i małych zwierząt.

3. Dodatek pirofosforanu sodu umożliwia dokładne oznaczenie Cu w stężeniach około 4 γ ml (surowice częściowo zhemolizowane)

4. Ze względu na dużą trwałość wytworzonego kompleksu barwnego metoda nadaje się dobrze do oznaczeń seryjnych.

Piśmiennictwo

1. Brown N. A.: Research of Vet. Sci., 3 (1962) 345.
2. Mc Farlen W. D.: Biochem. J., 26 (1932) 1022.
3. Gran G.: Anal. Chim. Acta, 14 (1956) 150.
4. Gubler C. J. i wsp.: J. Biol. Chem., 196 (1962) 209.
5. Hütterer F., Hunya T.: Schweiz. Med. Wschr., 87 (1957) 190.
6. Jacobsen E. i wsp.: Anal. Chim. Acta, 24 (1961) 579.
7. Middleton K. R.: Analyst, 90 (1965) 234.
8. Nilsson G.: Acta Chem. Scand., 4 (1950) 205.
9. Peterson R. E., Bollier M. E.: Anal. Chem., 27 (1955) 1195.
10. Smith G. F., Mc Curdy W. H.: Anal. Chem., 24 (1952) 371.
11. Smith G. F., Wilkins D. H.: Anal. Chem., 25 (1953) 510.
12. Stevančević D. B.: Zeitschrift Anal. Chemie, 165 (1959) 343.
13. Taucin E. Ja.: Opredelenje mikroelementov w organizmie životnyh. Riga 1962.
14. Ventura S., White J. C.: Analyst., 79 (1954) 39.
15. Zak B.: Clinica Chim. Acta, 3 (1958) 328.

H. ZAIDLER, W. HEESCHEN

Leukometr, prosty przyrząd, służący do pośredniego oznaczania ilości leukocytów w krwi bydlęcej

Instytut Higieny Mleka Państwowego Ośrodka Badawczego i Zakładu Badawczego Gospodarki Mlekiem w NRF
Kierownik: prof. dr A. TOLLE

W akcji zwalczania białaczki bydlęcej, której diagnoza opiera się na badaniu krwi, coraz większego znaczenia nabiera kwestia ustalenia liczby leukocytów.

Obliczenia ilości białych ciałek krwi można dokonać w powszechnie stosowanych komorach do liczenia składników krwi (Türka, Neubauera, Bürkera i inn.). Jednakże do badań masowych metoda ta jest nieprzydatna z uwagi na znaczną pracochłonność. W praktyce weterynaryjnej liczenie przy pomocy wyżej wspomnianych komór jest często niewykonalne ze względu na trudności techniczne.

Dokładne i szybkie ustalenie ilości leukocytów we krwi możliwe jest przy zastosowaniu tzw. elektronicznych celoskopów, opartych na zasadzie Coultera. W NRF prowadzi się od 1965 r. akcję zwalczania białaczki. W tym celu zaopatrzoneo weterynaryjne pla-

cówki badawcze w w/w celoskopy elektroniczne. Heesch i Krüger (1963) oraz Rojahn i Tolle (1963) opisali działanie tych przyrządów, ich dokładność i efektywność.

Uzupełnieniem wspomnianej metody może być pośrednie oznaczanie liczby leukocytów we krwi (przeprowadzone po raz pierwszy przez Schalma w 1963 r.) przy pomocy udoskonalonej i zmodyfikowanej przez niego metody kalifornijskiego testu stosowanego przy zapaleniu wymion (CMT). Metoda ta, zwana także testem Schalma, polega na reakcji określonych komórek jądrazstych z pewnymi powierzchniowo-aktywnymi substancjami z grupy alkailo-arylo sulfonianów. Powstawanie żelu przy tej reakcji spowodowane jest obecnością kwasu dezoksyrybonukleinowego (DNS) w jądrach komórek. Jaartsveld (1961) zmodyfikował

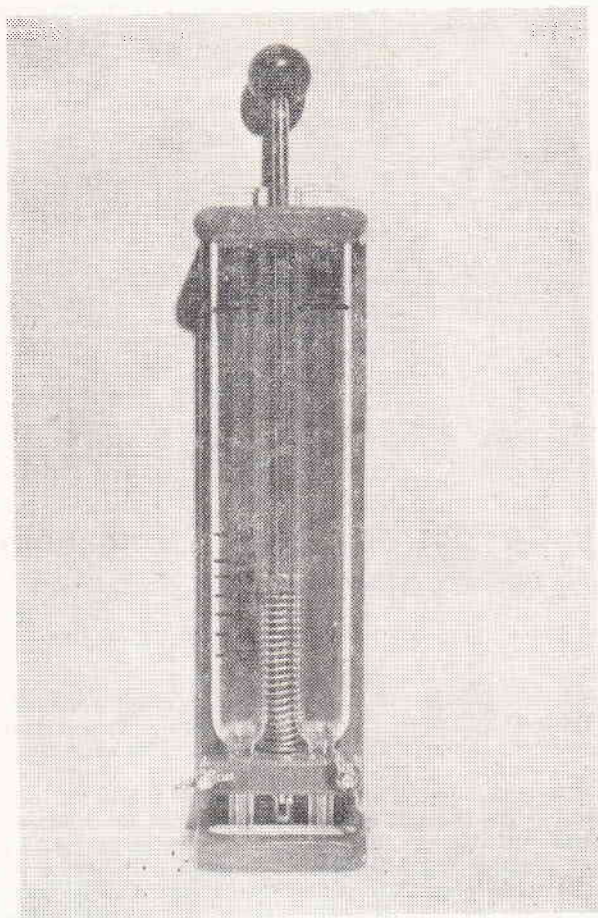
CMT przy pomocy nacechowanych probówek przepływowych (kapilar z nasadzonym lejkiem), umożliwiając dokładniejszy pomiar zmiany konsystencji roztworu. *Straub* (1964) i *Kraft* (1964) mieszają określoną ilość krwi z płynem testowym *Schalm* i, w zależności od ilości wytwarzającego się żelu w naczyniach, wnioskuje o liczbie białych ciałek krwi. *Bec-kers-Heitkamp* i *Jaartsveld* (1964), stosują w celu ustalenia ilości leukocytów metodę przepływową wg barbańskiego testu stosowanego przy zapaleniu wymion, przy czym miarą ilości leukocytów jest czas przepływu mieszaniny płynu testowego z rozcieńczoną krwią. Według ich danych, mogą być klasyfikowane jedynie próbki krwi, które zawierają ponad 30.000 leukocytów. *Schalm* (1964) eksperymentował również przy pomocy metody przepływu. Rezultaty wskazują, że tą metodą można osiągnąć nieźle przybliżone wyniki.

Badania wstępne potwierdziły wyniki uzyskane przez wspomnianych autorów. Zachęceni łatwością uzyskiwania powtarzalności wyników pomiarów, skonstruowaliśmy przyrząd, umożliwiający w sposób nieskomplikowany określenie liczby leukocytów, z dokładnością, wystarczającą dla celów praktycznych.

Przyrząd (leukometr, rys. 1, 2 i 3) składa się z plastikowego statywu, w którym umieszczone są dwie jednakowe nacechowane probówki przepływowe. Dolne końce probówek dają się łatwo i szybko otwierać i zamykać za pomocą odpowiedniego mechanizmu.

Rys. 1: leukometr

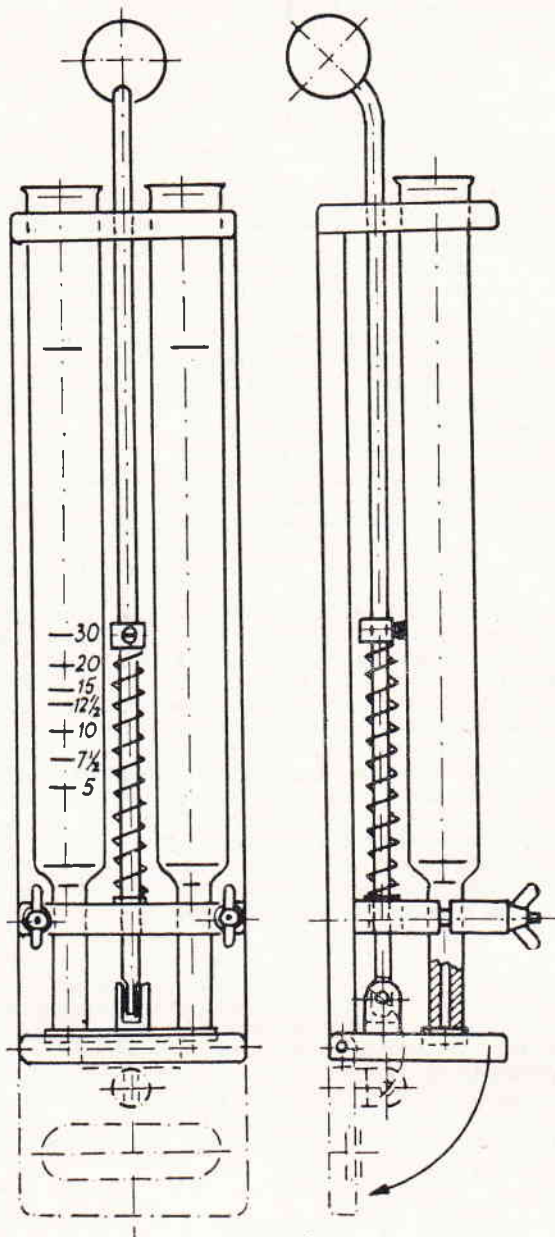
Rys. 2: szkic leukometru w skali



1. Leukometr

Rys. 3: sposób posługiwania się przyrządem podczas przepływu.

Działanie aparatu polega na tym, że dokonującą się na skutek reakcji badanego płynu na określoną



Rys. 2. Schemat leukometru

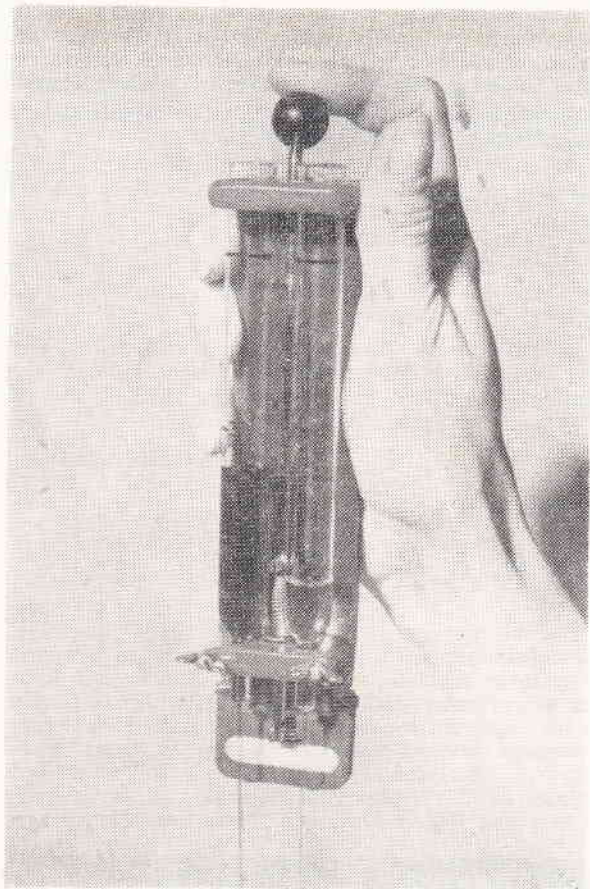
ilość krwi, zmianę konsystencji, mierzy się metodą przepływu, przy pomocy drugiej probówki kontrolnej, którą dla porównania napełnia się tylko płynem testowym. Probówka kontrolna pełni w pewnym sensie funkcję stopera, przy pomocy którego określa się pozostałość cieczy w probówce testowej, po upływie określonego czasu przepływu.

Po zakończeniu przepływu należy odczytać liczbę leukocytów na skali rurki testowej.

Określenie liczby leukocytów wymaga następujących materiałów pomocniczych:

1. Probówek z krwią, zmieszanych z heparyną (np. 0,2 ml 1,5% roztworu Vetrena z 5 ml krwi)
2. 1,5% roztworu laurylowego siarczanu sodowego jako płynu testowego
3. Kilku sztuk pipetek 0,2 ml
4. Leukometru

W celu przeprowadzenia badania, obie probówki, zamknięte przy pomocy specjalnego mechanizmu, napełnia się płynem testowym aż do górnej kreski.



3. Przyrząd w czasie pracy

Przy pomocy pipetki wpuszcza się 0,2 mln krwi z heparyną do próbówki testowej. Następnie obie próbówki natychmiast zamyka się przy pomocy przycisku. Następnie należy pięciokrotnie przechylić przyrząd, tak aby przez powolny przepływ pęcherzyków powietrza w obie strony, osiągnąć równomierne wymieszanie płynu z krwią. Napełnianie próbówek płynem testowym i przechylanie ich musi być wykonane bardzo ostrożnie, w przeciwnym bowiem razie powstaje piana, która utrudnia odczytanie wyników. Po przemieszaniu otwiera się szybko zamek za naciśnięciem guziczka i próbówka musi być tak długo otwarta, póki nie opróżni się próbówka kontrolna. Należy przy tym uważać, aby przyrząd w czasie przepływu znajdował się o ile możliwości w pozycji pionowej. Po zamknięciu obu próbówek, odczytuje się liczbę leukocytów na umieszczonej tam skali. W celu uzyskania większej precyzności umieszcza się na skali wartości 5, 7,5, 10, 12,5, 15, 20 i 30. Wyrażają one liczbę leukocytów w tysiącach. Wartości znajdujące się w tych przedziałach, w zakresie do 15.000 dają się ustalić z dokładnością do ok. ± 1.000 . Wartości 20 i 30 stanowią natomiast jedynie punkt zaczepny dla stwierdzenia ostrej względnie b. ostrej leukocytozy.

Po odczytaniu liczby leukocytów usuwa się pozostałości z próbówki testowej. Mycie, bądź płukanie rurki po każdej próbie nie jest konieczne, ponieważ płyn testowy działa jednocześnie jako środek zmywający. Natomiast pipetki wymagają gruntownego oczyszczenia.

Zbadanie jednej próbki pochłania 1,5 min. czasu. Przy pewnej wprawie można z łatwością odtworzyć wyniki pomiarów. Ważne jest, by badający próbkę trzymał się ściśle wskazań technicznych. Rzecz polega na tym, by natychmiast po wkropleniu krwi przechylić przyrząd.

Przedłużanie mieszania prowadzi do błędnych wyników.

Tab. Zestawienie porównawcze ilości leukocytów w krwi bydlęcej przy użyciu leukometru z badaniami przeprowadzonymi przez 6-ciu różnych badaczy oraz potrójnym badaniem elektronicznym

Krowa	wiek	Okreslenie ilosci leukocytow prze 3 różne osoby przy zastosowaniu leukometru						Potrojne elektroniczne liczenie			Skład morfologiczny krwi					
Nr	lata	1	2	3	4	5	6	1	2	3	Limf.	Pat	Seg.	Mon.	Eoz.	Baz.
1	3	9500	8500	8000	8000	8000	8000	9200	8600	9300	69	1	16	—	14	—
2	2	8500	8500	8000	8000	7500	7500	8900	8100	8400	66	3	21	—	9	1
3	2	9000	9000	9000	9000	8500	9000	9900	9400	9500	67	—	15	—	18	—
4	6	6000	6000	6000	6000	6000	5500	6100	6100	5400	78	2	4	—	14	2
5	5	10000	10000	8500	9000	9000	8500	10000	10500	9500	65	—	25	—	10	—
6	10	30000	30000	30000	30000	30000	30000	27000	27400	26200	85	2	3	—	10	—
7	7	7500	7500	7500	7500	7500	7000	7900	8100	7100	54	—	39	—	7	—
8	7	7000	7500	7500	7500	7000	7500	7600	7300	7900	70	—	16	—	14	—
9	7	7000	7000	7000	8000	7000	7000	6800	6800	6500	66	—	22	—	11	1
10	2	13000	12000	12 500	13000	10000	11000	13300	12800	12900	65	4	18	—	13	—
11	2	12500	12000	12 000	12500	12000	12000	12400	13100	12900	62	—	17	—	21	—
12	7	7000	7000	7000	7500	7500	7500	7400	7200	7100	30	—	26	1	43	—
13	9	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	23000	22700	22100	79	—	9	—	12	—
14	10	8000	9000	9000	8500	9000	9000	9200	9300	9300	63	—	20	—	17	—
15	4	8000	8000	7500	7500	7500	7500	8200	7800	7700	80	—	15	—	5	—
16	5	15000	16000	14500	14000	15000	14000	16300	15000	15800	72	—	17	—	11	—
17	5	8500	9000	9500	8000	9500	8500	10200	10200	9500	67	—	21	—	12	—
18	9	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	>20000	24800	25200	24400	86	—	5	2	7	—
19	2	11000	12000	11000	12000	10000	12000	10900	111000	11100	70	—	22	2	6	—
20	3	8000	8000	7500	8000	8000	7500	8800	8700	9000	64	—	22	2	12	—
21	4	13000	13000	12500	13000	13000	12500	14400	14800	14600	75	—	10	—	15	—
22	6	7500	8000	7500	7500	7500	7500	8300	7900	7900	65	—	20	—	14	1
23	5	11000	10500	10000	10000	10000	10000	10400	10400	9800	66	—	14	3	17	—

W celu nacechowania przyrządu, którego próbówki testowe zaopatrzone były w skalę pomiarową, zbadaliśmy ok. 1.200 próbek krwi, a rezultaty porównaliśmy z wynikami uzyskanymi drogą pomiarów elektronicznych.

Zbadaliśmy też wpływ temperatury, stwierdzając przy tym, że wyniki pomiarów w granicach od 5° do 25° pozostały w praktyce bez zmian.

Wiek zwierząt nie miał również wpływu na wyniki badań, zważywszy, że granica 2 lat i powyżej jest bardzo ważna dla stwierdzenia białaczki. Również morfologia krwi nie miała, jak się wydaje, żadnego wpływu na dokładność pomiarów, bowiem mimo znacznych odchyleń w składzie różnych komórek krwi wartości z leukometru zgodne są z wartościami pomiarów elektronicznych.

Krew, przechowywana w temperaturze pokojowej powinna być zbadana najdalej w ciągu 5 godzin po pobraniu. Jeśli próbki krwi przechowywane są w lodówce, badanie winno nastąpić w ciągu 24 godzin.

Aby zademonstrować prostotę i dokładność działania prób leukometrycznych, poleciliśmy zbadanie próbek krwi różnym osobom, niezależnie od siebie i niezależnie od kontrolnych pomiarów elektronicznych.

Przeprowadzający badanie 3, 4 i 5 posługiwali się leukometrem po raz pierwszy (tabela).

Tabela: Porównanie liczby leukocytów w krwi bydlęcej uzyskanej przez sześć różnych osób przy pomocy leukometru z trzykrotnymi pomiarami elektronicznymi.

Z wyjątkiem próby 10, przeprowadzonej przez badającego nr 5 osiągnięto we wszystkich wypadkach duży stopień zgodności.

Sądzymy, że dzięki skonstruowaniu leukometru powstał przyrząd, który umożliwia praktykującemu lekarzowi weterynarii zbadanie liczby leukocytów we krwi pojedynczych zwierząt, bądź całych stad.

Tłum. K. Zabolicki

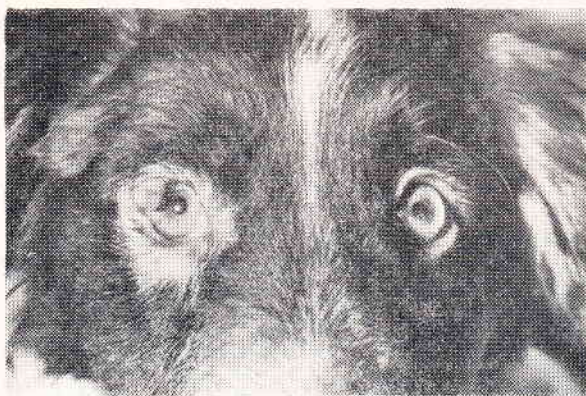
NOTATY Z PRAKTYKI

MATYŁDA SZCZUDŁOWSKA

TORBIEL ZASTOINOWA GRUCZOŁU ŁZOWEGO (DACRYOPS)

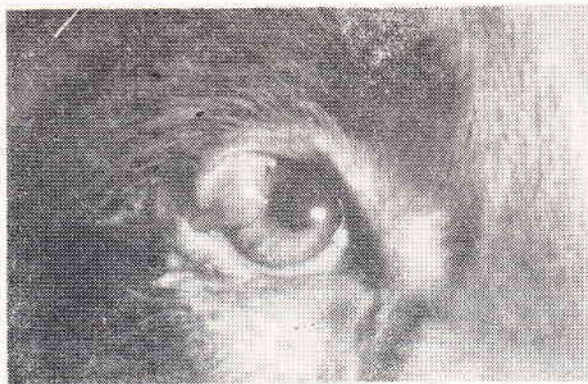
Katedra Chirurgii i Okulistyki WSR we Wrocławiu
Kierownik: prof. dr RYSZARD BADURA

Nie często spotykanym w piśmiennictwie weterynaryjnym przypadkiem niedrożności przewodów wyprowadzających łzy jest torbiel zastoinowa gruczołu łzowego u 3-miesięcznego legawca. Przedstawiona na zdjęciach twarzowa część głowy psa przykuwa uwagę niezwykle wyglądem prawego oka. W rozwartej szparze powiekowej dostrzega się w zewnętrznym kącie twór krągły, wielkości grochu, barwy białawo-różowej, wysunięty spod górnej powieki i przysłaniający gałkę oczną między godz. 9—12 tarczy zegarowej. Twór ten wypukła nieznacznie powiekę, pozornie obrzękniętą i wywołuje stan zapalny spojówki z wysiękiem surowiczno-śluzowym, spływającym po sierści w okolicy przysrodkowego kąta oka. W dotknięciu twór niewyraźnie chęłbocze wykazując przy tym szerokie usadowienie w skroniowej części górnego załamka spojówki. Umieszczenie i chęłbotanie tworu wskazywało na torbiel zastoinową gruczołu łzowego, a informacja o zabawie psa z kotem potwierdziła przypuszczenie, że zamknięcie przewodu wyprowadzającego powstało z blizny po wygojonym zadrażnieniu spojówki.



Torbiel została usunięta po odurzeniu szcznięcia domięśniowym zastrzykiem prep. Combelen i po miejscowym znieczuleniu oka kokainą. Nieznaczny krwotok wstrzymano wkrótce tamponem, a ubytek spojówki po usunięciu torbieli zeszyło cienkim katgutem.

Badanie histopatologiczne usuniętego tworu wykazało budowę złożoną ze zgrubiałych pasm tkanki łącznej, wśród których spotyka się małe ogniskowe nacieki komórek jednojądrzastych. Twór jest pokryty zgru-



białym, wielowarstwowym nabłonkiem płaskim, ostro odgraniczonym od tkanki łącznej. Całość obrazu odpowiada budowie przewlekłej ziarniny zapalnej i tym samym potwierdza w zupełności diagnozę kliniczną, określającą twór torbielopodobny, jako torbiel zastoinową gruczołu łzowego (dacryops).

Torbiele zastoinowe tworzą się zwykle w górnym, lub w dolnym załamku spojówki. Kanalik wyprowadzający łzy może być zatłoczony zągęszczoną wydzielaną, tkanką bliznowatą, lub obrzękiem zapalnym spojówki. U ludzi są dodatkowe gruczoły łzowe (Krause); i one są często siedliskiem takich torbieli. Torbiele te leżą głęboko w podścielisku i zwykle są następstwem przewlekłego zapalenia. Torbiele takie są otoczone jednym lub dwoma pokładami płaskich komórek nabłonkowych. Niekiedy spotyka się kilkupłatowe, względnie kilkupęcherzowe torbiele, otoczone typowym nabłonkiem spojówki.

Torbiel zastoinowa gruczołu łzowego, względnie jego przewodu wyprowadzającego, powinna być usunięta. Z czasem bowiem powiększając się torbiel wysuwa się spod powieki i staje się przeszkodą widzenia,