

przed upływem czasu adsorpcji wirusa, dodać do podwójnego płynu Earla podwójną ilość antybiotyków (po 200 j. na ml) oraz zwykłą ilość czerwieni fenolowej. Odpowiednią ilość tego płynu przemieścić do jałowego cylindra, następnie dodać taką samą ilość odwirowanego ekstraktu embrionalnego i cylinder dostawić do łaźni wodnej o temperaturze 43—45°. Gdy upływie czasu adsorpcji wirusa, dodać do cylindra należną ilość rozpuszczonego agaru, dokładnie wymieszać i z cylindra pozostającego stale w łaźni wodnej rozlewać zawartość ciepłą, lecz niegorącą pipetą na płytki. Płyn nalewać po ściance, po czym zakreślić płytką, celem wymieszania płynów oraz celem pokrycia warstwą agaru także i części ścianki płytki. Chroni to przed podplywaniem na dno płytki płynów odżywczych, dodawanych później na powierzchnię warstwy agarowej. Po zakrzepnięciu agaru, płytki ustawić dnem do góry w cieplarni z dopływem CO₂. Wytworzenie się „plaques” w przypadku wirusów ospy ptaków wymaga przy tej metodzie 6—10 dni inkubacji. Zachodzi więc konieczność „dożywiania” komórek w tym okresie czasu (18). W tym celu w trzecim i szóstym dniu inkubacji dać na powierzchnię agaru płyn odżywczy o składzie: jedna część ekstraktu embrionalnego i dwie części zwykłego płynu Earla. Na płytce o średnicy ca 40 mm dać 1,0—1,5 ml płynu, na płytce większe odpowiednio więcej.

6 części	80% pł. Eagla ⁴⁾ (podwójny)	koncentrat witamin ¹⁾	20 ml
		roztwór aminokwasów L ²⁾	20 ml
5 części	2% agar Difco w wodzie redestylowanej	glutamina 5% roztwór wodny ³⁾	6 ml
		antybiotyki	po 200 000 j.
		pł. Earla podwójny (NaHCO ₃ pojedynczo)	ad 1 000 ml
		20% surowica cieleca	

¹⁾ TC Vitamins Eagle 100 X, DIFCO. ²⁾ TC Amino Acids L 100 X, DIFCO. ³⁾ TC Glutamine Sterile 5% desiccated, DIFCO. ⁴⁾ W razie potrzeby pH powyższego płynu można korygować przez dodanie 8—10% NaHCO₃.

W metodzie wzorowanej na metodzie Dulbecco (5), „overlay” składa się z podwójnego płynu Eagla (przygotowanego na podwójnym płynie Earla) i z surowicy cielecej, zmieszanych w proporcji 6:5 z 2% agarem. Dokładny skład ilustruje następujące zestawienie:

Technika wykonania jest analogiczna jak poprzednio opisano. Przy tej metodzie ogniska wywoływane przez wirusy ospy ptaków pojawiają się wcześniej, bo na 5—6 dzień po zakażeniu hodowli i nie zachodzi potrzeba dodawania płynów odżywczych na powierzchnię agaru. Metoda druga jest wygodniejsza, wymaga jednak stosowania importowanych preparatów, w metodzie pierwszej preparaty te zastępuje ekstrakt embrionalny.

Piśmiennictwo

- Bamberger K., Markovits P.: Acta Vet. Acad. Sci. Hung. 15, 161, 1965.
- Bang F. B., Levy E., Gey G. O.: J. Immunol. 66, 329, 1951.
- Bierbaum G., Gaede H.: Arch. wiss. u. prakt. Tierheilk. 69, 441, 1935.
- Doyle T., Dobson N., Martin R.: Vet. Rec. 75, 359, 1963.
- Dulbecco R.: J. exp. Med. 99, 167, 1954.
- Dulbecco R., Vogt M.: Proc. Nat. Acad. Sci. 38, 376, 1952.
- Findlay G. M.: Brit. J. Exp. Path. 9, 28, 1928, cyt. za 17.
- Kangude G. M., Hanson L. E.: J. vet. anim. Husb. Res. (Mhow). 6, 1, 1962.
- Kärber G.: Naunyn-Schmiedebergs Arch. exp. Path. Pharmak. 162, 480, 1931.
- Köhler H., Schwöbel W.: Zbl. Bakt. I Orig. 166, 454, 1956.
- Larski Z.: Wirusologia Weterynaryjna, PWRiL Warszawa 1965.
- Loewenthal H.: Klin. Wschr. 7, 349, 1928, cyt. za 17.
- Malicki K.: Med. Dośw. i Mikrobiol. 1967/1968 — w druku.
- Malicki K.: Medycyna Wet. 1967 — w druku.
- Mayr A.: Berl. Münchener Tierärztl. Wschr. 16, 316, 1963.
- Mayr A., Hartig F., Bayr I.: Zbl. f. Vet. Med., Reihe B, 12, 41, 1965.
- Mayr A., Kalcher K.: Arch. ges. Virusforsch. 10, 72, 1960.
- Mayr A., Kalcher K.: Arch. ges. Virusforsch. 11, 307, 1961.
- Mayr A., Malicki K.: Zbl. f. Vet. Med., Reihe B, 13, 1, 1966.
- Przesmycki F.: Zarys Wirusologii Praktycznej, PZWL, Warszawa 1963.
- Reed L. J., Muench H.: Amer. J. Hyg. 27, 493, 1938.
- Woodruff A. M., Goodpasture E. W.: Amer. J. Path. 7, 209, 1931.
- Younger J. S.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 85, 202, 1954.

Adres autora: dr Konrad Malicki, Warszawa, ul. Juliana Bruna 14 m. 20.

KRYSTYNA ZIMOWSKA

Ocena metod oznaczania poziomu magnezu w surowicy

Katedra Farmakologii Wydziału Weterynarii WSR w Lublinie
Kierownik: prof. dr G. STAŚKIEWICZ

Do oznaczania poziomu magnezu w surowicy stosuje się szereg metod i jak dotychczas żadna z nich nie została uznana za metodę standardową.

W ostatnich latach za najbardziej przydatną do badań klinicznych uważa się metodę Lange'go (9) lub Andreansena (1). W pracy tej zajęliśmy się oznaczaniem poziomu magnezu w surowicy sześcioma metodami w celu wybrania jednej z nich nadającej się najlepiej do rutynowych oznaczeń.

Materiał i metody.

Badano surowice od 10 krów rzeźnych, w okresie od 28.IX.—6.X.1966 r. następującymi metodami:

I. Metoda pośrednia przez oznaczenie fosforu (2, 6) polega na wytrącaniu magnezu w postaci osadu fos-

foranu amonowo-magnezowego, kolorometrycznym określeniu związanego fosforu metodą Fiskego-Subbarowa i obliczeniu równoważnej zawartości magnezu.

II. Metoda Carubelliego (4,10) i III. metoda Holska i Flaschka (5). Polegają na kompleksometrycznym miareczkowaniu magnezu, kompleksem III wobec czerni eriochromowej T w środowisku amoniakalnym, po uprzednim usunięciu wapnia.

IV. Metoda Büchnera i Schöne (3) polega na spalaniu surowicy z H₂SO₄ i 30% H₂O₂ w celu usunięcia nadmiaru szczawianu amonu, który tworzy z magnezem kompleks i utrudnia obserwację miareczkowania (3). Po spaleniu płyn neutralizuje się i oznacza magnez przez miareczkowanie kompleksem III.

V. Metoda Lange'go (9).

VI. Metoda Andreansena (1). W obu metodach żółcień tytanowa w środowisku alkalicznym pH 11—12 tworzy z koloidalnie rozproszonym wodorotlenkiem magnezowym czerwony związek kompleksowy, któ-

rego ekstyncję oznacza się na fotometrze *Pulfricha* stosując filtr S 53. Właściwości te po raz pierwszy stwierdził *Kolthoff* (7).

Wyniki

Poziomy magnezu w surowicy oznaczone przy pomocy tych metod podano w tabeli 1.

Tabela 1.

Surowica	Wartości Mg (mg%) oznaczone metodami					
	I	II	III	IV	V	VI
1	2,69	2,47	2,57	2,55	2,45	2,36
2	2,70	2,66	2,55	2,48	2,26	2,18
3	2,62	2,71	2,75	2,60	2,36	2,40
4	2,58	2,50	2,48	2,40	2,18	2,20
5	2,56	2,45	2,32	2,38	2,19	2,30
6	2,60	2,52	2,40	2,32	2,20	2,28
7	2,60	2,38	2,40	2,35	2,30	2,32
8	2,65	2,60	2,58	2,51	2,10	2,14
9	2,50	2,45	2,44	2,35	2,20	2,28
10	2,55	2,50	2,60	2,45	2,20	2,26

Wyniki otrzymane wg powyższych metod są zbliżone, jednak metody polegające na oddzielaniu wapnia od magnezu i na wytrącaniu magnezu w postaci fosforanu amonowo-magnezowego są metodami pracochłonnymi, wymagającymi kilku dni oznaczeń, zużywającymi dosyć dużą ilość odczynników, poza tym wytrącanie wapnia szczawianem amonu jest niezupełne (3), co z pewnością wpływa na wynik. W metodach polegających na oznaczeniu magnezu przez miareczkowanie kompleksom III napotyka się na pewną trudność, gdyż przejście barwy przy końcu miareczkowania jest niezbyt wyraźne.

Ponieważ metody V i VI okazały się najbardziej proste, dlatego w dalszej pracy zajęto się tylko nimi. W toku badań okazało się, że zabarwienie roztworów w metodzie VI jest zbyt intensywne (ekstyncja 1,4—1,5) dlatego ostatecznie wybrano metodę *Lange'go* (5) (ekstyncja 0,5—0,7).

Odczynniki.

1. Kwas trójchlorooctowy 5%.
2. 0,1% wodny roztwór alkoholu poliwinylowego.
3. Roztwór żółci tytanowej — podstawowy. Rozpuścić 75 mg żółci tytanowej w 100 ml 0,1% roztworu wodnego alkoholu poliwinylowego.
4. Roztwór żółci tytanowej — roboczy. Rozcieńczyć roztwór podstawowy w stosunku 1:10 roztworem 0,1% alkoholu poliwinylowego. Sporządzać w dniu użycia.
5. 2,5 n wodorotlenek sodu.
6. Wzorcowy roztwór magnezu — macierzysty. 1,0135 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ rozpuszcza się w wodzie i dopełnia w kolbie miarowej do 1 l. 1 ml tego roztworu zawiera 0,1 mg Mg.
7. Wzorcowy roztwór magnezu — roboczy. 20 ml roztworu wzorcowego Mg dopełnić wodą w kolbie miarowej do 100 ml. Otrzymuje się roztwór 2 mg% Mg.

Wykonanie

Do 1 ml surowicy dodać 5 ml kwasu trójchlorooctowego, dobrze wymieszać i odwirować. 3 ml supernatantu odpipetować do probówki, dodać 2 ml roztworu roboczego żółci tytanowej i 1 ml 2,5 n NaOH. Analogicznie przygotowuje się wzorzec i ślepa próbę biorąc w miejsce surowicy 1 ml roztworu wzorcowego roboczego magnezu i 1 ml wody do próby ślepej. Po 10—20 minutach od momentu dodania NaOH wykonuje się oznaczenia na fotometrze *Pulfricha* wobec wody, stosując filtr S 53.

Obliczenia.

$$mg\%Mg = \frac{E \text{ próby} - E \text{ próby ślepej}}{E \text{ wzorca} - E \text{ próby ślepej}} \cdot \text{stęż. wzorca}$$

$$mEq | 1Mg = \frac{mg\% Mg}{1,2}$$

Aby przekonać się o powtarzalności wyników uzyskanych tą metodą wykonano 10 oznaczeń zawartości magnezu w jednej surowicy. Uzyskano następujące wyniki: 2,20, 2,00, 2,10, 2,17, 2,00, 2,16, 2,05, 2,09, 2,10, 2,14 mg% Mg. Średnia 2,10 mg% \pm 0,12. Dokładność metody sprawdzono przez dodanie do badanych prób surowic standardowego roztworu magnezu (tab. 2).

Tabela 2.

Dodano Mg mg	Znaleziono Mg mg	Różnica
0	2,2	—
0,25	2,48	+ 0,03
0,50	2,70	0
1,00	3,25	+ 0,05
2,00	4,40	+ 0,2

Sprawdzono także czy poziom magnezu w surowicy zmienia się w zależności od czasu przechowywania surowicy w lodówce (0°—4°). Otrzymano następujące wyniki: wartość pierwszego dnia — 2,16 mg%, drugiego — 2,15 mg%, trzeciego — 2,13 mg% i czwartego — 2,10 mg%.

Wnioski.

Metoda *Lange'go* jest metodą szybką (jedno oznaczenie przy 20 próbach trwa ok. 5 minut), dokładną, nadaje się do rutynowego oznaczania magnezu w surowicy.

Piśmiennictwo

1. *Andreasen E.*: J. Clin. Lab. Investigation 9, 138—143, 1957.
2. *Balachowskij S. A., Balachowskij M. C.*: Metody Chimicznego analiza krwi. Medgiz. Moskwa, 1953.
3. *Büchner H., Schöne W.*: Pharmazie 10, 190, 1955.
4. *Carubelli R., Smith W. O., Hammarsten J. F.*: Clin. Chem. 5, 45, 50, 1959.
5. *Holašek A., Flaschka H.*: Hope — Seyler's Zetschrift für physiologische Chemie 290, 57, 1962.
6. *Juszkiewicz T., Gorzelewska K., Madejski Z.*: Medycyna Wet. 13, 546—549, 1957.
7. *Kolthoff J. M.*: Biochem. Z. 185, 344, 1927.
8. *Marczenko Z.*: Odczynniki organiczne w analizie nieorganicznej. Warszawa, 1959.
9. *Steinbach G., Ertler W., Meyer H., Schimmel D.*: Arch. Exp. Vetmed. 18, 845, 1964.
10. *Szczeptański L., Berbec H., Wiśniewska M.*: Pol. Arch. Med. 33, 675, 1963.

Adres autora: mgr Krystyna Zimowska, Lublin, ul. Akademicka 11, Katedra Farmakologii.

CONNOLLE M. D., LAWS L., HART R. K.: Zapalenie wymion bydła wywołane przez *Mycoplasma sp.* (*Mastitis in cattle caused by Mycoplasma sp.*). Aust. vet. J. 43, 157, 1967, (5).

Z 91 próbek mleka pochodzących od 23 krów mlecznych z objawami łagodnie przebiegającego zapalenia wymienia wyosobniono w 35 przypadkach (14 krów) drobnoustroje z grupy *Mycoplasma*. Wstrzyknięcie hodowli wyizolowanych drobnoustrojów do ćwiartki wymienia krwi w okresie laktacji powodowało łagodne zapalenie tej jak również sąsiedniej ćwiartki wymienia po tej samej stronie. Wyosobnione drobnoustroje różniły się od *Mycoplasma mycoides*, mimo że posiadały pewne wspólne z nią komponenty antygenowe. Były one serologicznie pokrewne (odczynn OWD) z *Mycoplasma sp.* wyizolowanymi w Queensland z przypadków zapalenia stawów u cieląt.

Z. G.