

zagranicy zanim zostanie rozprowadzony do ferm wolnych od białaczek.

W fermach zakażonych wszystkie ptaki z objawami klinicznymi wzbudzającymi podejrzenia białaczek lub choroby Mareka t. zn. wychudzonych, z objawami nerwowymi, ze zmianami w oczach, z niewyjaśnioną przerwą w nieśności, żółtaczką lub anemią powinny być przeznaczone na ubój. Stada o wysokim procencie zakażenia lub ostrą formą choroby Mareka powinny być w całości przeznaczone na ubój.

Fermy hodowlane i reprodukcyjne posiadające białaczki powinny być zamknięte w pierwszym roku nieśności. Wysoko produkcyjnym nioskom należałoby przedłużyć wiek reprodukcyjny. Ponadto w hodowlach zarodowych można wprowadzać linie genetycznie odporne,

przez likwidację rodzin u których stwierdzono białaczkę lub chorobę Mareka. Z ogólnych przepisów profilaktycznych na uwagę zasługuje polecenie odchowu młodzieży w ścisłej izolacji od stada dorosłego, a w fermach zakażonych prowadzenie odchowu na innym terenie.

Walka z tą grupą chorób jest niezwykle trudna. Fakt gwałtownego ich rozprzestrzeniania się w świecie uwidacznia bezradność zootechniki i weterynarii. Wydaje się być celowym powołanie zespołu kompetentnego, który w oparciu o współpracę obu tych nauk opracuje wytyczne zwalczania.

Wykaz piśmiennictwa znajduje się u autora.

Adres autora: Wanda Borzemska Warszawa, ul. Grochowska 272.

KRYSTYNA WILCZYŃSKA-CIEMIĘGA, MARIAN GRUNDBOECK

## Zastosowanie różnych antykoagulantów w hematologicznym rozpoznawaniu białaczek u bydła

Pracownia Patologii Komórkowej Instytutu Weterynarii w Puławach  
Kierownik: doc. dr M. GRUNDBOECK

W pierwszym opisie uproszczonej metody hematologicznego rozpoznawania białaczek (1) zalecone jest sporządzanie preparatów z krwi świeżej, względnie szczawianowej. Dalsze badania nad przydatnością do tej metody również innych środków hamujących krzepnięcie krwi są przedstawione w niniejszym doniesieniu. W badaniach zwrócono przede wszystkim uwagę na wpływ użytych w doświadczeniu związków, na poziom limfocytów, czas hemolizy preparatów oraz na barwność komórek.

### Materiał i metody

Do badań użyto krwi czterech krów. Obok krwi świeżej, niekonserwowanej posłużono się próbkami zawierającymi następujące środki hamujące krzepnięcie:

- 1) heparyna — 2 j. m. (0,02 mg) na 1 ml krwi,
- 2) szczawiany amonu i potasu zmieszane w stosunku wagowym 3:2 (wg Wintrobe'a — 3) — 2 mg na 1 ml krwi,
- 3) szczawian sodu — 2 mg na 1 ml krwi,
- 4) wersenian dwusodowy — 0,2 mg na 1 ml krwi,
- 5) wersenian dwusodowy z formaliną (wg Tolle Jahne — 2).

Odczynnik wymieniony w punkcie 5, otrzymuje się przez zmieszanie 25 g wersenianu dwusodowego, 95 ml wody destylowanej i 5 ml formaliny. Ponieważ wersenian nie rozpuszcza się w całości w tych warunkach, podczas rozlewania odczynnika do próbek wstrząsano co chwilę naczynie, by utrzymać zawiesinę w stanie jednorodnym.

W krwi świeżej oznaczono poziom limfocytów jednorazowo, a w próbkach niekrzepliwych po upływie: 2 godzin, 24 godzin, 48 godzin, 4 dni i 6 dni.

Ogólną liczbę białych krwinek oznaczono w komorze Bürkera, a odsetek limfocytów obliczono w rozmazie krwi barwionym metodą Pappenheima. Obok

wyliczonej na tej podstawie ilości limfocytów w 1 mm<sup>3</sup> krwi wyznaczono tę wartość metodą uproszczoną (1). Celem zbadania wpływu poszczególnych antykoagulantów na hemolizę i barwność preparatów przechowywanych przez różny przeciąg czasu, sporządzono po 7 preparatów z każdej próbki krwi. Preparaty te poddawano kolejno hemolizie po: 2 godzinach, 24 godzinach, 48 godzinach, 4 dniach, 8 dniach i 14 dniach. Czas hemolizy każdego preparatu był mierzony. Po wybarwieniu sudanem czarnym i błękitem metylenowym dokonano oceny morfologii komórek oraz intensywności ich zabarwienia.

### Wyniki

Wyrażony liczbami względnymi poziom limfocytów w próbkach krwi z dodatkiem różnych środków hamujących krzepnięcie przedstawiono w tabeli 1. Ponieważ przy użyciu obydwu metod liczenia krwinek otrzymano

Tab. 1. Poziom limfocytów w krwi konserwowanej różnymi antykoagulantami. Liczby przedstawiają średnie wartości procentowe względem poziomu limfocytów w krwi świeżej

Czas przechowywania krwi	Heparyna 2 j.m./ml	Szczawiany amonu i potasu wg Wintrobe'a	Szczawian sodu 2 mg/ml	Wersenian dwusodowy 0,2 mg/ml	Wersenian dwusodowy z formaliną wg Tolle i Jahne'go
2 godziny	100	100	100	100	100
24 godzin	93	90	81	81	100
48 godzin	75	84	71	65	100
4 doby	53	65	46	50	98
6 dób	47	—	—	33	96

podobne wartości, reprezentowane są one w tabeli przez wspólne liczby procentowe.

W krwi konserwowanej heparyną po upływie jednej doby zaznaczył się jedynie kilkuprocentowy spadek poziomu limfocytów, który po upływie dalszych 24 godzin osiągnął już wielkość 25%. W następnych dwóch badaniach poziom tych komórek obniżył się w przybliżeniu do połowy początkowej wartości.

Krew konserwowana mieszaniną szczawianów amonu i potasu zachowywała prawidłową konsystencję do czterech dni włącznie, później zaś stwierdzono w próbkach koagulanty. Liczba limfocytów po dwu dobach przechowywania krwi stanowiła jeszcze ponad 80% początkowej wartości.

Krew z dodatkiem szczawianu sodu po dwóch godzinach przechowywania pozwoliła na uzyskanie podobnych wyników jak krew świeża. Po 24 godzinach obserwowano tu już około 20% spadek liczby limfocytów. Krew z dodatkiem szczawianu sodu nadawała się do badań tylko przez 4 dni.

Podobnie zachowywał się poziom limfocytów w krwi z dodatkiem samego wersenianu dwusodowego. Próbkę krwi konserwowane tym związkami nie wykazywały widocznych zmian w konsystencji przez całe 6 dni, co pozwoliło na przeprowadzenie wszystkich okresowych badań.

W krwi konserwowanej wersenianem dwusodowym i formaliną wg Tolle i Jahnke'go limfocyty utrzymywały się najdłużej. Poziom tych komórek wykazał tylko niewielki spadek w badaniach przeprowadzonych po 4 i po 6 dniach przechowywania próbek krwi.

Jak wskazuje tabela 2 środki hamujące krzepnięcie w niewielkim stopniu przedłużały czas hemolizy preparatów w uproszczonej metodzie. Najslabiej zaznaczyło się to przedłużające hemolizę działanie w przypadku użycia wersenianu sodu z formaliną, najsilniej zaś w

Tab. 2. Czas hemolizy preparatów w uproszczonej metodzie obliczania limfocytów, zależnie od środka konserwującego i czasu przechowywania preparatów

Środek konserwujący	Czas hemolizy (w minutach) preparatów przechowywanych przez:						
	2 godz.	24 godz.	48 godz.	4 doby	6 dób	8 dób	14 dób
Heparyna (2 j. m./ml)	1,5	2	2,25	3	4	4	4
Szczawiany amonu i potasu wg Wintrobe'a	2	3	5	5	5	5	5
Szczawian sodu 2 mg/ml	1,5	2	2	2,5	3	3	3
Wersenian dwusodowy 0,2 mg/ml	2	2	2	2	2,5	2,5	3
Wersenian dwusodowy z formaliną wg Tolle i Jahnke'go	2	2,5	3	3	3	3	3
Krew świeża niekonserwowana	1,5	2	3	2	2	3	3

próbkach z dodatkiem szczawianów amonu i potasu.

Użyte w doświadczeniu antykoagulanty wywierały różny wpływ na barwliwość krwinek sudanem czarnym w metodzie uproszczonej. Najbardziej ujemny wpływ wywierało tu użycie heparyny. Granulocyty w krwi heparynizowanej słabo barwiły się, na skutek czego trudno je było odróżnić od limfocytów. Najlepiej barwiły się sudanem granulocyty w krwi konserwowanej wersenianem dwusodowym i formaliną. Były one tu nawet lepiej wybarwione niż w krwi nie zawierającej żadnych antykoagulantów. Nadto stwierdzono, że ani czas przechowywania krwi konserwowanej (w granicach do 6 dni) ani czas przechowywania preparatów (do 14 dni) nie wywierają widocznego wpływu na barwliwość krwinek.

### Wnioski

Wersenian dwusodowy z formaliną wg Tolle i Jahnke'go najlepiej ze wszystkich badanych antykoagulantów zapobiegał rozpadowi limfocytów zwiększając równocześnie barwliwość białych krwinek. Z tego względu konserwowanie krwi według powyższej metody nadaje się szczególnie do hematologicznych badań rozpoznawczych w kierunku białaczki metodą uproszczoną.

### Piśmiennictwo

1. Grundboeck M.: *Medycyna Wet.* 23, 116, 1967.
2. Tolle A., Jahnke H. D.: Die Stabilisierung von Blutproben und ein Verfahren zur hämatologischen Reihenuntersuchungen auf Rinderleukose, *Zbl. Veterinärmed.* B, 12, 210, 1965.
3. Wintrobe M. M., cyt. wg.: E. H. Whitby and C. J. C. Britton: *Disorders of the Blood*, London, J. and

Adres autorów: Puławy, Al. Partyzantów 55, Instytut Weterynarii.

Вильчиньска-Цементга К., Грундбэк М. — **Применение разных антикоагулятов при гематологической диагностике лейкоза крупного рогатого скота.**

Количество лимфоцитов в крови крупного рогатого скота устанавливали применяя гепарин, динатриумдигидрогенэтилендиамитетраацетат (Хелаплекс III), оксалаты и Хелаплекс III с формалином по Толле и Янкэ. Параметры установленные для крови храненой от 2 часов до 6 дней сравнивали с полученными в свежей крови. Подсчет лимфоцитов проводили при помощи конвенциональной техники, а также при помощи упрощенного метода по Грундвэку. Установили, что в связи с хранением крови появляется снижение числа лимфоцитов и изменения в их свойствах. Самым соответственным методом как для конвенционального так и упрощенного методов определения количества лимфоцитов оказалось применение препарата Хелаплекса III с формалином.

Wilczyńska-Ciemięga K., Grundboeck M. — **The application of various anticoagulants in the hematological diagnosis of bovine leukosis.**

The number of lymphocytes was estimated in the bovine blood treated with heparin, EDTA (Titriplex III), oxalates, and EDTA with formalin according to Tolle and Jahnke (2). The values obtained in blood stored for 2 hours to 6 days were compared with figures obtained in the fresh blood. The lymphocyte counts were estimated with the conventional techni-

ques as well as with the simplified method according to Grundboeck (1). The decrease of lymphocyte number and the changes in properties of cells connected with storage of blood were observed. The

conservation of blood samples with EDTA with formalin according to Tolle and Jahnke appeared to be the most suitable for both the conventional and the simplified technique.

ANTONI CHOCHA, ANDRZEJ LEWANDOWSKI

## Obraz immunoelektroforetyczny u bydła z białaczkopodobnym obrazem krwi

Centralne Laboratorium Szpitala Wojewódzkiego w Zielonej Górze  
Kierownik: lek. med. A. CHOCHA

Duże straty w hodowli, wynikające z późnego rozpoznania klinicznego białaczki stawiają to schorzenie w rzędzie jednego z pierwszych w celu zwalczania, łącznie z gruźlicą i brucelozą. Rozpoznanie na podstawie objawów klinicznych w początkowym okresie jest praktycznie niemożliwe i wymaga dokładnych badań laboratoryjnych do których zaliczamy:

a) badania hematologiczne. Występująca w różnym stopniu hiperplazja układu hemopoetycznego w krwi obwodowej charakteryzuje się zwiększeniem liczby krwinek białych, zwiększeniem liczby limfocytów i pojawieniem się limfoblastów w rozmazach krwi obwodowej. Brak jest jednak współzależności między liczbą leukocytów w krwi, a stopniem nasilenia hiperplazji, oraz nie we wszystkich przypadkach białaczek spotyka się zmiany we krwi obwodowej.

Jak podaje Winquist (6) znaczny odsetek białaczek przebiega w postaci aleukemicznej. Potwierdził to Bendixen (1) który podaje w swej pracy, że około 30,6% przebadanego bydła z typowymi białaczkowymi zmianami anatomicznymi miało obraz hematologiczny ujemny.

b) punkcja szpiku kostnego. Przy białaczce, w szpiku wzrasta ilość komórek układu erytropoetycznego i w mniejszym stopniu liczba komórek obojętnochnych, wzrasta też liczba limfocytów i o ile przekracza 30% wszystkich komórek zwierzę należy uznać za podejrzane o białaczkę.

W świetle przytoczonych faktów widzimy, że celem wykrycia postaci aleukemicznej konieczne jest oprócz badania krwi przeprowadzenie badań uzupełniających.

Wprowadzenie do pracy laboratoryjnej elektroforezy skłoniło badaczy do przebadania frakcji białkowych surowicy w białaczce u bydła. Hartung (4) przebadał 10 sztuk bydła ze zmianami białaczkowymi i stwierdził w 30% wzrost alfa-globulin, w 50% gamma-globulin i w 60% spadek ilości albumin przy zachowanym stałym poziomie białka w surowicy.

Wprowadzenie do analizy białek immunoelektroforezy przez Grabara i Williamsa (3) pozwala na bardziej dokładne prześledzenie zmian w frakcjach białkowych surowicy. Tormo (5) zastosował immunoelektroforezę do badania

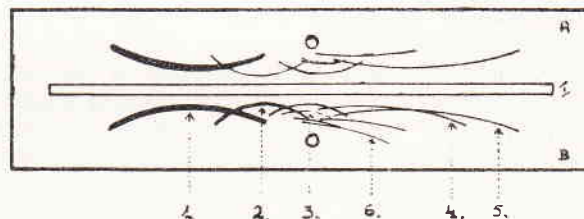
frakcji białkowych w surowicy u świń. W oparciu o te doniesienia postanowiono przebadać immunoelektroforetycznie surowicę bydła z białaczkopodobnym obrazem krwi.

### Materiał i metody

W celu wyodrębnienia chorego bydła ze zmianami białaczkopodobnymi przebadano bydło z obory PGR Damno, Jeziorka, i W. Wici pow. Lubsko. Za obraz krwi w normie przyjęto wg Sovy (7): erythrocyty  $x = 6\,759\,000/\text{mml}$ , hemoglobina 10,6 g%, hematokryt 38,1%, leukocytoza 7200/mml. Jako było chore przyjęto limfocytozę powyżej 18 000/mml oraz zmiany w rozmazie charakteryzujące się obecnością limfoblastów oraz limfocytów powyżej 80%. Z przebadanego materiału otrzymano 11 krów z białaczkopodobnym obrazem krwi tj. 4 z PGR Damno (nr kolczyka 629, 720, 642, 613), 3 z PGR W. Wici (nr kolczyka 252, 342, 134) i 4 z PGR Jeziorka (nr kolczyka 428, 402, 436, 407). Immunoelektroforezę wykonano wg metody mikro na żelu agarowym, w buforze weronalowym o  $\text{pH} = 8,2$  i sile jonowej 0,05. Jako antyserum użyto surowicy króliczej własnej produkcji ze zwierząt uodpornionych surowicą krów zdrowych.

### Wyniki

Na schemacie 1 przedstawiono obraz immunoelektroforetyczny w części A krowy zdrowej a w części B krowy z białaczkopodobnym obrazem krwi obwodowej i szpiku. W odniesieniu do immunoelektroforezy w surowicy prawidłowej stwierdzono: w obszarze alfa<sub>2</sub>-globulin wyraźne wysycenie łuku odpowiadają-



Schemat 1. Immunoelektroforegram surowicy krowy zdrowej i z białaczkopodobnym obrazem krwi i szpiku.

Objaśnienia:

- I = rowek naniesienia antyserum anty surowicy krowiej.
- A = immunoelektroforegram surowicy krowy zdrowej.
- B = immunoelektroforegram surowicy krowy z białaczkopodobnym obrazem krwi obwodowej.
- 1 = łuk precypitacyjny albumin,
- 2 = łuk precypitacyjny haptoglobiny,
- 3 = łuki precypitacyjne beta<sub>1</sub> globulin,
- 4 = łuk precypitacyjny beta<sub>2A</sub> globulin,
- 5 = łuk precypitacyjny gamma globulin,
- 6 = łuki precypitacyjne beta<sub>2</sub> globulin.