

Jedynie u niewielkiej ilości ryb końce płatków skrzelowych zachowały formę buławkowatą, co świadczyło o sklejeniu się błaszek skrzelowych w tych miejscach. Poza tym u ryb, u których proces chorobowy był bardzo zaawansowany, stwierdzono martwicę płatków skrzel.

Porost na dnie i ścianach stawków zmienił swe zabarwienie z brązowego na intensywnie zielone na skutek dominacji sinic.

W celu nie dopuszczenia do nawrotu choroby polecono zmienić dotychczasowy system odprowadzenia wody ze stawków rotacyjnych z górnego na dolny. Pozwoliło to na lepszy spływ wytwarzających się w wodzie i opadających na dno kłaczek, odrywających się od podłoża przy czyszczeniu stawków. Przy odpływie ze stawów umieszczono siatki o średnicy oczek 4 mm. Narybek miał rozmiary większe i nie zachodziła obawa ucieczki jego ze stawu. Dzięki temu zabiegowi kłaczki nie osadzały się już na skrzelach ryb. Wszystkie powyższe zabiegi dały pozytywne rezultaty. Śnięcia nie powtórzyły się, a odłowiony narybek był normalnie żywotny i w dobrej kondycji. Dzięki szybkiej interwencji i przerwaniu procesu chorobowego ostateczne straty przy odłowieniu stawków nie były zbyt wysokie i wyniosły szacunkowo 30—40%.

Wnioski

1. Opisany przypadek śnięcia narybku ryb łososiowatych wskutek martwicy płatków skrzelowych wykazał, że na etiologię tego schorzenia mają niewątpliwie wpływ niekorzystne warunki środowiskowe, a zwłaszcza zanieczyszczenie organiczne. Poprawa warunków środowiskowych powoduje cofnięcie się zmian chorobowych i powrót do normalnego stanu zdrowia u ryb.

2. Zasadniczym zaleceniem profilaktycznym jest zapewnienie w stawach optymalnej wymiany i należytego krążenia wody oraz odpowiednie dozowanie ilości karmy celem niedopuszczenia do jej zalegania i rozkładu.

3. Kąpiel ryb w zieleni malachitowej oraz podawanie antybiotyków i witamin są korzystnymi zabiegami pomocniczymi. Jak się wydaje, powodują one likwidację zewnętrznych pasożytów oraz niekorzystnej flory bakteryjnej i tym samym ułatwiają organizmowi zwalczenie choroby.

Piśmiennictwo

1. Davis H. S.: Culture and diseases of game fishes. University of California press. Berkeley and Los Angeles 1956.
2. Davis H. S.: Care and diseases of trout. United States Government Printing Office 1946.

Adres autora: doc. dr Tadeusz Bory Miączyński, ul. Karmelicka 14, 31-128 Kraków.

WOJCIECH NOWACKI

Identyfikacja narządowa fosfatazy zasadowej (AP) u psów

Z Instytutu Patologii i Terapii Zwierząt Wydziału Weterynaryjnego AR we Wrocławiu

W poprzedniej pracy (2) opisano zachowanie się fosfatazy zasadowej surowicy suk w przebiegu niektórych schorzeń ginekologiczno-polożniczych w aspekcie diagnostycznej przydatności wykrywania wzrostu aktywności tego enzymu. Nie było jednak wówczas możliwe wskazanie źródła narządowego tego enzymu.

W doniesieniu niniejszym przedstawione jest porównawcze badanie zymogramów AP z homogenizatów narządowych w zestawieniu z izoenzymem normalnie obecnym w surowicy psów zdrowych i w surowicy suk w przebiegu schorzeń narządu rodnego.

Materiał i metody

Materiał stanowiły:

1. surowice 27 psów (13 od zwierząt zdrowych — 12 suk i 1 samca, 14 od suk z rozpoznaniem *endometritis* lub *metritis purulenta* i *pyometra* (15));
2. homogenaty narządów pobranych od 3-letniej suki i 15-letniego psa — wycinki wątroby, nerek, śledziony, jelit — dwunastnicy, jelita czczego, biodrowego i prostnicy oraz macię i szpik z kości udowej pobrano bezpośrednio po uśpieniu zwierząt;
3. homogenaty macię 2 suk poddanych histerek-tomii w związku z rozpoznaniem ropomacierzem.

Próbki narządów mięsowych, wycinki macię i jelit starannie odpłukano w lodowatym płynie fizjologicznym, a następnie w 0,25 m sacharozie (11). Z rozłupanej kości udowej wydobyto szpik. Tak przygotowany wstępnie materiał poddano mechanicznemu rozdrobieniu, a następnie homogenizacji przez 10 minut w chłodzonym lodem móździeru Weigla.

Ze względu na konieczność wprowadzenia drobnych modyfikacji recepturowych przy sporządzaniu homogenatów, podano pełen tok postępowania.

W trakcie homogenizacji dodawano rozcieńczony w stosunku 1:20 bufor aktywujący fosfatazę alkaliczną. Bufor macierzysty składał się z 1,5 m tris i 0,2 m alaniny; do pH 9,5 adiustowany był 0,1 m kwasem cytrynowym (3). Stosunek objętościowy buforu do homogenizowanego materiału był bliski 1:2. W trakcie homogenizacji dodawano również kilka kropli niejonowego detergentu Triton x-100, by wspomóc uwalnianie enzymu z mitochondriów, lizosomów i jąder (13). Do 5 ml homogenatu dodawano, kropla po kropli, 2 ml n-butanolu wychłodzonego do temperatury 0°C, mieszając i ogrzewając do 37°C przez 5 min. W ciągu następnych 5 minut homogenat ochłodzono w lodowatej łaźni wodnej i odwirowano przy 20 000 g przez 20 min. w temperaturze 4°C. Wirowanie rozdzielało mieszaninę na 3 warstwy: górną butanolową, środkową zdenaturowanego białka i dolną wodną, zawierającą AP (12). Na dnie osiadały czasem większe zbitte cząstki materiału. Warstwę wodną zawierającą fosfatazę zasadową odciągano pi-

petą pasterowską i przechowywano w temp. -18°C do momentu poddania jej rozdzielni elektroforetycznemu w żelu agarowym Difco-Agar Noble 1,2% w buforze weronalowym wg Grabara (5) pH 8,2 przy napięciu 100 V i natężeniu wyjściowym 70mA na 10 szkiełek podstawowych przez 1 godz. i 15 min.

Elektroforezę w żelu krochmalowym wykonano, niosząc materiał na podwójne inserty*) Whatman 3 o wymiarach 1×1 cm. Elektroforezę poziomą prowadzono w układzie buforów wg Poulika (10) przy gradacji potencjału 8 V/cm, do momentu oddalania się linii boranowej o 8 cm od linii startu.

Miejsca aktywności AP wykazano, stosując beta-naftylo-fosforan sodu i Fast Blue RR (9, 14) w buforze boranowym o pH 9,5 zawierającym MgSO_4 .

Homogenat wątroby 2 psów, homogenat macicy 3 psów i 10 próbek surowicy od zwierząt chorych i zdrowych poddano testowi oporności na temperaturę 56°C w ciągu 10 i 15 minut. Wrażliwość na działanie mocznika sprawdzono w następującym ciągu molarności: 0,25; 0,5; 0,75; 1,0; 1,5; 2,0; w gradacji wzrostu molarności o 1 mol do 8,0 (1). Sprawdzono też zgodność trasy migracji elektroforetycznej w żelu krochmalowym izoenzymu występującego w surowicy i poszczególnych narządach. W tym celu rozdzielono elektroforetycznie mieszaninę surowicy i homogenatów narządów w zestawieniu z surowicą natywną i czystymi homogenatami.

Wyniki i omówienie

Rozdział elektroforetyczny w żelu agarowym izoenzymów AP pochodzących z homogenatów różnych narządów nie ujawnił dostatecznie wyraźnie zróżnicowania badanego enzymu. Dlatego w analizie porównawczej i wnioskowaniu oparto się na rozdziale elektroforetycznym w żelu krochmalowym (3, 4, 7, 8, 10, 12). Spektrum izoenzymów AP wyciągów jednoimiennych narządów zdrowej suki i zdrowego psa jest identyczne (ryc. 1).



Ryc. 1. Test pokrywalności migracji elektroforetycznej

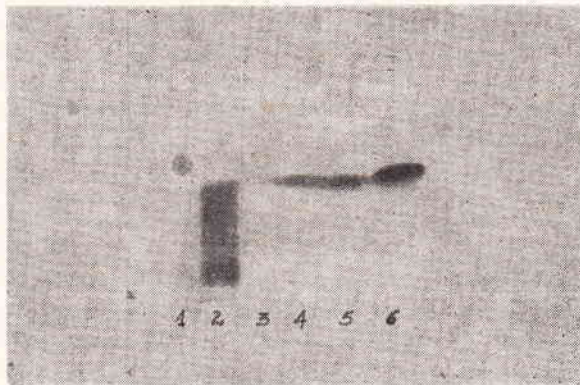
Objaśnienia: 1 = homogenat wątroby; 2 = homogenat wątroby + surowica suki z ropomaciczem (1:1); 3 = surowica suki z ropomaciczem; 4 = homogenat macicy + surowica suki z ropomaciczem (1:1); 5 = homogenat macicy. Homogenaty narządowe: 6 = nerka; 7 = szpik; 8 = śledziona; 9 = wątroba; 10 = jelito czcze; 11 = prostata; 12 = macica; 13 = surowica suki zdrowej; 14-15 = surowice suk z ropomaciczem.

Aktywność AP widoczna w surowicach badanych zwierząt, zarówno zdrowych jak i ze schorzeniami narządu rodowego, umiejscowiona jest na wysokości izoenzymu wątrobowego, a częściowo także na wysokości czoła aktywności homogenatu macicy.

*) insert — skrawek bibuły.

W surowicach zwierząt zdrowych aktywność AP jest znikoma lub praktycznie niewidoczna; tylko u 7 osobników spośród 27 badanych, widoczny był ślad aktywności umiejscowionej przy linii startu po jej stronie doanodowej.

W teście oporności na temperaturę izoenzym pochodzący z wątroby tracił w ciągu 15 min. w 56°C szacunkowo około 50—60% aktywności.



Ryc. 2. Test oporności na temperaturę

Objaśnienia: 1, 3, 5 = homogenat macicy, surowica, homogenat wątroby — poddane działaniu temp. 56°C przez 15 min.; 2, 4, 6 = kontrola — homogenat macicy, surowica, homogenat wątroby.

W tych samych warunkach izoenzym pochodzenia macicznego ulegał prawie całkowicie zniszczeniu (ryc. 2).

Niskie stężenia mocznika nie inhibowały AP surowicy i izoenzymu wątroby. W przedziale stężenia od 0,25 do 0,5 mola mocznik działał aktywnie, obserwowano wzmożoną aktywność fosfatazy zasadowej, zarówno surowiczej jak i wątrobowej. Dopiero po przekroczeniu stężenia 1 mola aż do 3 moli obserwowaliśmy stopniowy spadek aktywności z tendencją do całkowitego zaniku przy stężeniu powyżej 3 moli.

In vivo obserwowano podobny wpływ mocznika u owiec żywionych z jego dodatkiem: dawka 15 g powodowała gwałtowny wzrost aktywności AP w surowicy. W przypadku dawek powodujących zatrucie, aktywność enzymu spadła do wartości subnormalnych (6).

Enzym macicy wykazywał stały spadek aktywności pod wpływem wzrastających stężeń mocznika. Zanik aktywności obserwowaliśmy w stężeniach powyżej 2 moli.

Test zgodności migracji elektroforetycznej wykazał całkowitą pokrywalność alkalicznej fosfatazy surowicy z izoenzymem wątroby (ryc. 1).

Wnioski

W świetle przedstawionych wyników twierdzić można, że wzrost aktywności fosfatazy zasadowej w surowicy suk w przebiegu schorzeń ginekologiczno-położniczych pochodzi głównie z izoenzymu wątrobowego, a nie z macicy. Świadczą o tym wyniki testów laboratoryjnych np. wrażliwości na temperaturę, na wzra-

stające molarności mocznika, migracja elektroforetyczna, a także wysoki wzrost aktywności tej frakcji AP u suk po usunięciu macicy oraz identyczna lokalizacja izoenzymu surowiczego u suk i samców. Ponadto elektroforeza krochmalowa surowic suk z ropomaciczem nie wykazuje aktywności izoenzymów charakterystycznych dla spektrum fosfatazy zasadowej macicy.

Wyniki powyższe pozwalają twierdzić, że wzrost aktywności AP w przebiegu schorzeń narządu rodnego u suk jest objawem nieswoistym, nie mniej może być z powodzeniem wykorzystany w zespole badań klinicznych.

Piśmiennictwo

1. Bahr M., Wilkinson J. H.: *Clinica chim. Acta* 17, 367, 1967.
2. Balbierz H., Nowacki W., Senze A.: *Medycyna Wet.* 32, 348, 1976.
3. Boyer S. H.: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 103, 938, 1963.
4. Gabrys K.: *Pol. Arch. Med. wewn.* 46, 273, 1971.
5. Grabar P., Burtin P.: *Analyse immuno-électrophorétique*, Masson et C^{ie}, Paris 1960.
6. Kwiatkowski T.: Przydatność oznaczania aktywności fosfatazy zasadowej, zawartości białka całkowitego i wielkości wskaźnika albuminowo-globulinowego w surowicy w ocenie wydolności wątroby owiec karmionych wzrastającymi dawkami mocznika w paszy. *Zesz. Nauk. AR we Wrocławiu, Weterynaria — w druku.*
7. Latner A. L., Skillen A. W.: *Isoenzymes in biology and medicine*. Academic Press London and New York 1968.
8. Lewin B., Lipschutz D., Bernstein J., Newman C.: *Obstetrics and Gynec.* 31, 424, 1968.
9. Markert C. L., Moller F.: *Proc. natn. Acad. Sci. USA* 45, 753, 1959.
10. Paulik M. D.: *Nature*, Lond. 180, 1477, 1957.
11. Roberts E. D. P., Nowiński W. W., Saez F. A.: *Biologia komórki*, PWN, 1974.
12. Robinson J. C., Pierce J. E.: *Science* 150, 58, 1965.
13. Szczekliki E.: *Enzymologia kliniczna*. PZWL 1974.
14. Wtome R. J.: *Agar Gel Electrophoresis*, Elsevier Publ. Comp. Amsterdam, London 1965.
15. Zakiewicz M.: *Chirurgia małych zwierząt*. PWRiL 1970.

Adres autora: lek. wet. Wojciech Nowacki, pl. Grunwaldzki 49, 50-366 Wrocław.

Новацки В. — Идентификация алкалической фосфатазы (НР) в органах собак.

Целью работы были идентификация источника щелочной фосфатазы органов, которой уровень в сыворотке крови сук растёт во время гинекологическо-акушерских заболеваний. Исследовали: сыворотки крови 27 собак (13 здоровых и 14 больных); гомогенаты органов суки и пса: двенадцатиперстной кишки, тонких кишек, подвздошной кишки, прямой кишки, матку и костный мозг (взяты непосредственно после умерщвления животных); гомогенаты маток 2 сук подвергнутых гистеректомии в связи с установленной пиометрой.

В исследованиях применяли следующие метода: электрофорез в желе крахмала, тест совпадения миграции фракций, тест чувствительности к растущей концентрации мочевины и тест неподатливей на температуру 56° в течение 10 и 15 минут. Проведенные исследования позволяют утверждать, что описанный энзим AP происходит из печени. Исследование изменений его активности может быть полезным в диагностике и прогнозе эндометрита и пиометрита у сук.

Nowacki W. — Organic identification of alkaline phosphatase in the dog.

The purpose of the work was to identify a source of the organ alkaline phosphatase (AP), which the level in sera of female dogs increases in the course of obstetric diseases. The studies were performed with sera of 27 dogs (13 clinically normal, 14 sick), homogenates of internal organs derived from female and male dogs (specimens of liver spleen, small intestines — duodenum, ileum, jejunum, and rectum; uterus and bone marrow obtained right after euthanasia) and homogenates of uteri of two hysterectomized female dogs with pyometra. The following methods of examination were applied: starch electrophoresis, fraction-migration covering test, test of the sensitivity to increased concentrations of urea, resistance to 56°C for 10 and 15 min. The studies showed that the determined AP isoenzyme in sera is the liver origin. Its determination may be helpful in diagnosis and prognosis of endometritis, purulent mastitis and pyometritis in female dogs.

MOSSELL D. A. A., VEGA C. L., PUT H. M. C.: Dalsze badania nad przydatnością różnych podłoży zawierających antybiotyki o działaniu przeciwbakteryjnym w oznaczaniu pleśni w produktach spożywczych i w środowisku. (Further studies on the suitability of various media containing antibacterial antibiotics for the enumeration of moulds in food and food environments). *J. appl. Bact.*, 39, 15—22, 1975 (1).

Określono przydatność do ilościowego oznaczania pleśni w produktach spożywczych agar z wyciągiem drożdżowym, glukozą i oksytetracykliną (OGVA), agar z wyciągiem drożdżowym, glukozą i gentamycyną (GGYA), agar zawierającego chlorotetracyklinę i czerwień bengalską (CRA) oraz agaru z dodatkiem chloramfenikolu i streptomycyny i agaru z wyciągiem drożdżowym, glukozą i oksytetracykliną, gentamycyną i dodatkiem czerwień bengalskiej (OGGYA). Oznaczenia przeprowadzono wg metody płytek lanych. Uzyskane wyniki wskazują na pełną przydatność badanych podłoży do oznaczania pleśni. Dodatek do podłoży czerwień bengalskiej wpływał jednakże hamująco na wielkość kolonii. Agar z wyciągiem drożdżowym, glukozą i oksytetracykliną tracił własności bakteriostatyczne po posiewach materiału zawierającego duże ilości białka oraz po przedłużonym inkubowaniu w temperaturze 37 i 25°C. W przypadkach przedłużonej inkubacji zamiast oksytetracykliny należy stosować chloramfenikol.

G.

STRATING A.: Szczepionka przeciwdrozwowa u psów: efektywność szczepionki przy zakażeniu zjadliwym szczepem wirusa nosówki w aerozolu. (Measles vaccine in dogs: efficacy against aerosol challenge with virulent canine distemper virus). *J. Am. vet. med. Ass.*, 167, 59—62, 1975 (1).

Skuteczność szczepionki przeciwdrozwowej w zapobieganiu zakażenia zjadliwym szczepem wirusa nosówki psów (szczep Snyder Hill) przebadano na szczepieniach w wieku 49—70 dni. 29 szczepień zaszczepiono jedną z trzech szczepionek (D-Vac-M, Heterovac, Enduracell D-M) opartych o szczep Edmonston wirusa odry, 6 szczepień zaszczepiono żywą zmodyfikowaną szczepionką przeciwko nosówce, a 15 nieszczepionych szczepień stanowiło grupę kontrolną. Szczepionki podawano domięśniowo w ilości 1,0 ml. Dawka szczepionki przeciwdrozwowej wynosiła 10^{4,5}—10^{5,0} TCID₅₀, zaś szczepionki przeciwko nosówce 10^{3,0}—10^{3,5} TCID₅₀. Szczepienia zakażono szczepem zjadliwym w aerozolu między 5—7 tygodniem po szczepieniu dawką 1000 LD₅₀ dla nerek i 45 LD₅₀ dla psów. Spośród zwierząt szczepionych szczepionkami przeciwdrozwowymi padła jedna sztuka, u 7 wystąpiła nosówka o ostrym przebiegu, u 15 nosówka przebiegała w postaci łagodnej a 6 sztuk nie chorowało. Wszystkie szczepienia zaszczepione szczepionką przeciwko nosówce nie chorowały po zakażeniu sztucznym szczepem zjadliwym wirusa nosówki psów.

G.