

CZESŁAWA GÓRSKA, JERZY GÓRSKI

Właściwości immunogenne aerozolowej szczepionki przeciwko nosówce dla nerek i tchórzofretek

Z Zakładu Mikrobiologii, Pracownia Immunoprofilaktyki Instytutu Weterynarii w Puławach oraz Z Puławskich Zakładów Przemysłu Bioweterynaryjnego

Rozwój badań w zakresie technologii leków w aerozolu umożliwił opracowanie także biopreparatów w tej postaci. Zastosowanie praktyczne znalazły szczepionki aerozolowe dla ptaków oraz zwierząt futerkowych (6, 7, 14, 16, 17, 19, 21). Aerozolową szczepionkę przeciwko nosówce Candur S für Nerze (Behringwerke) stosuje się w większych fermach nerek w krajach zachodnich i skandynawskich oraz w Polsce (1, 12—17). Przebadano również występowanie odporności u fretek szczepionych tą metodą (4).

Celem pracy było sprawdzenie nieszkodliwości i zdolności uodporniających krajowej szczepionki przeciwko nosówce Canivac F Aerozol (Biowet — Puławy).

Materiał i metody

Szczepionka. Szczepionka zawiera żywy, atenuowany szczep wirusa nosówki (HK Led) namnażany w hodowli komórek (5) i zliofilizowany z odpowiednim zawieszalnikiem. Zamknięte pod próżnią fiołki, do czasu użycia, przechowywano w chłodni (2—4°C). Po sporządzeniu szczepionki wartość TCID₅₀ wynosiła ok. 10^{4,2}/1 fiołkę, a po 1 roku obniżyła się do ok. 10^{3,8}. Szczepionkę stosowaną metodą aerozolową rozpuszczano w rozpuszczalniku zawierającym 4 części wody dest. i 1 cz. glicerolu w proporcji 5 ml na 1 fiołkę, a przeznaczoną do iniekcji w 20 ml buforu fosforanowego.

Zwierzęta doświadczalne. Badania wykonano na ok. 1200 norkach różnych odmian — w wieku od 8 do 16 tygodni w gospodarstwie „K” w latach 1975—77. Ponadto, szczepionkę zastosowano dla 106 tchórzofretek zakupionych z hodowli, w której od szeregu lat nie szczepiono zwierząt przeciwko nosówce.

Stosowanie szczepionki. Preparat rozpylano aparatem Oxyparat (Asid) zasilanym sprężonym powietrzem (ciśnienie ok. 1,8 atm.). Dyszę wylotową tzw. pistoletu kierowano przez pokrywę siatkową do domków (kotników), w których przebywały 2 norki lub 2 tchórzofretki. Otwory wybiegowe pozostawiano zamknięte przez ponad 5 minut. Czas rozpylania szczepionki wynosił: 10, 15, 20, 30, 40, 45, 60, 90, 120 lub 360 sekund (s) — najczęściej 40—45 s. Norki lub tchórzofretki szczepione podskórnie otrzymywały przeważnie 1 ml szczepionki z fiołki rozpuszczonej w 20 ml. Dla niektórych zwierząt dawki zmniejszono — 1/50 fiołki lub zwiększono — 1/10, 1/5, 1/2 lub 1 fiołka na sztukę, stosując wówczas od 5 do 50 ml rozpuszczalnika.

Badanie serologiczne. Przed szczepieniem oraz w różnym okresie po szczepieniu (głównie przy uboju) od nerek pobierano krew do badania odczynem seroneutralizacji (SN). Surowice badano pojedynczo w sposób uprzednio opisany (8, 10, 13). Wyniki oceniano w następujący sposób: wartość lg₁₀SN₅₀ ≤ 0,35 wynik ujemny, wartość lg₁₀SN₅₀ ≥ 0,7 wynik dodatni. Z wyników indywidualnych obliczono średnią geometryczną (\bar{x} lg₁₀SN₅₀).

Zakażenie doświadczalne. Zakażenie zjadliwym wirusem nosówki wykonywano drogą parenteralną lub kontaktu. Warunki doświadczenia i charakterystykę użytego szczepu LL-68 opisano w pracach wcześniejszych (8, 10, 13). Po zakażeniu zwierzęta obserwowano przez 21—100 dni (zwykle ok. 35 dni).

Wyniki i omówienie

Przeprowadzone doświadczenia i obserwacje wykazały, że szczepionka Canivac F Aerozol stosowana drogą aerogenną jest nieszkodliwa dla nerek i tchórzofretek zarówno po 40—45 s rozpylania (przewidywane dawkowanie w tere-

Tab. 1. Występowanie przeciwciał i odporności u nerek po aerozolowym i podskórnym zastosowaniu szczepionki p-ko nosówce Canivac F

Dawkowanie	Wyniki badania serologicznego (po 62—150 dniach) w latach:					Wyniki zakażenia doświadczalnego (po 62—150 dniach) w latach:					
	1975	1976	1977	1975—1977		1975	1976	1977	1975—1977		
	+(Z ¹)	+(Z ¹)	+(Z ¹)	+(Z ¹)	%+	0(D ²)	0(D ²)	0(D ²)	0(D ²)	% odpor- nych	
W aerozolu przez:	15 S	3/4	—	4/6	7/10	70,0	—	—	—	—	—
	30 S	4/6	—	6/7	10/13	76,9	2/4	—	—	2/4	50,0
	40—45 S	5/6	24/25	21/21	50/52	96,4	5/5	7/8	7/7	19/20	95,0
	60 S	5/6	20/22	12/12	37/39	94,9	5/6	6/6	5/5	16/17	94,1
	90 S	11/11	—	—	11/11	100,0	—	—	—	—	—
120 S	4/4	4/4	2/2	10/10	100,0	4/4	1/1	2/2	7/7	100,0	
W in. s.c.	14/14	6/6	18/18	38/38	100,0	1/1	2/2	2/2	5/5	100,0	
Kontrola	0/9	0/12	0/7	0/28	0	0/3	0/4	0/5	0/12	0	
Candur S	7/7	6/7	12/13	25/27	92,6	—	2/2	2/2	4/4	100,0	

Objaśnienia: ¹) w liczniku — ilość nerek wykazujących obecność przeciwciał; w mianowniku — ilość nerek zbadanych, ²) w liczniku — ilość nerek zdrowych (odpornych); w mianowniku — ilość nerek użytych do doświadczenia.

nie), jak i po 360 s. Bezpieczeństwo szczepionki dodatkowo potwierdziły szczepienia parenteralne. Po podskórnym stosowaniu, nawet 1 fiołki dla norki lub tchórzofretki (równowartość co najmniej 50 dawek aerozolowych), nie obserwowano wystąpienia jakichkolwiek niekorzystnych reakcji poszczepiennych. Biorąc pod uwagę, że badania na norkach prowadzono przez 3 kolejne lata, a na tchórzofretkach nawet przez 5 lat oraz, że zostały one potwierdzone w innych ośrodkach (16, 21) można wyż. wym. szczepionkę ocenić jako preparat o dostatecznie dokładnie sprawdzonej nieszkodliwości. Ogółem w warunkach tzw. doświadczeń terenowych szczepionkę w postaci aerozolu zastosowano dla 547 fretek i tchórzofretok oraz ok. 4400 norek, a w iniekcji dla 150 tchórzofretok i ok. 1000 norek. Szczepionka stosowana drogą aerogenną lub parenteralną była nieszkodliwa również dla lisów (wyniki w opracowaniu do druku).

Wyniki badania zdolności uodporniających zebrano w tabelach 1, 2 i 3. Z tab. 1 wynika, że przy 15 i 30 s rozpylaniu znaczny odsetek norek pozostał poza zasięgiem działania uodporniającego. Wyraźnie korzystniejsze wyniki uzyskano u norek po 40–60 s stosowania szczepionki, ponieważ skuteczność szczepienia, oceniona na podstawie występowania przeciwciał i odporności na zakażenie doświadczalne, wahała się w poszczególnych latach od 83,3 do 100% — średnio ok. 95%. Wystąpienie przeciwciał i odporności u wszystkich szczepionych norek uzyskano przedłużając czas rozpylania do 90–120 s. Jednak ze względu na wymagania praktyki przyjęcie tak długiego czasu podnosiłoby znacznie czasochłonność szczepień i zużycie preparatu. Natomiast występowanie przeciwciał i odporności stwierdzono u wszystkich norek szczepionych parenteralnie.

Producent szczepionki Candur S zaleca 30 s czas rozpylania (w praktyce terenowej czas rozpylania jest zwykle nieco przedłużony). Przeprowadzone równoległe badania serologiczne norek szczepionych tą szczepionką wykazały, że przeciwciała występowały od 85,6 do 100% — średnio w 92,6% badanych próbek. Zakażeniu kontrolnemu poddano 4 norki, które okazały się odporne; w innym badaniu odporność stwierdzono u 7 z 8 norek (13).

Podjęto również próbę określenia minimalnego czasu rozpylania szczepionki dla tchórzofretok. Ustalono, że 20–360 s stosowanie aerozolu (dla 2 tchórzofretok) zapewniało odporność na wykonane po ok. 3 tyg. zakażenie wirusem zjadliwym (razem 31 zwierząt). Po 15 s rozpylania odporność wystąpiła u 2 z 4, a po 10 s rozpylania u 1 z 4 tchórzofretok.

Wyniki doświadczeń na tchórzofretkach można ocenić jako korzystniejsze — w porównaniu do osiągniętych w warunkach terenowych na norkach. Być może, że wpływa na to lepsza szczelność domków i nieco dłuższy czas pozostawiania zwierząt w zamkniętych domkach oraz różnica wielkości minimalnej dawki uodporniającej. U norek nie można wykluczyć ponadto ujemnego wpływu występowania zakażeń podklinicznych innymi wirusami. Zakażne zapalenie jelit stwierdzono w 1975 r. (11, 18), a w latach 1975–78 padnięcia wskazujące na występowanie choroby aleuckiej.

Z tab. 2 wynika, że wartości średnich geometrycznych, obliczone z wyników indywidualnych, uzyskanych w poszczególnych latach, układają się dość charakterystycznie. Najniższe wartości wystąpiły u norek szczepionych przez 15 i 30 s. Natomiast wyższe wartości uzyskano w grupach norek szczepionych przez 40–120 s. Na zbliżonym poziomie ukształtowała się

\bar{x} g SN_{50} norek szczepionych Candur S. Natomiast nieco wyższą wartość średniej wykazywały norki szczepione parenteralnie. Jednak próba ustalenia istotności tych różnic nie powiodła się — co wiąże się ze znacznym zasięgiem rozproszenia wyników indywidualnych (2). Jednocześnie należy zaznaczyć, że maksymalne miana SN_{50} u norek szczepionych np. przez 15 i 120 s miały wartość zbliżoną, a niższa wartość średniej jest wynikiem częściej notowanego braku przeciwciał w surowicach norek szczepionych tylko przez 15 lub 30 s.

W ocenie zdolności uodporniających każdej szczepionki należy uwzględnić także czas wystąpienia odporności (9, 10).

Tab. 2. Poziom przeciwciał (x g $Ig_{10}SN_{50}$) po erozolowym i podskórnym zastosowaniu szczepionki p-ko nosówce Canivac F

Dawkowanie	Dni po szczepieniu:					
	0	62	75	111	125	150
W aerozolu przez:	15 S			1,12	1,36	
	30 S	≤ 0,35		1,5	1,31	1,17
	40–45 S	≤ 0,35		2,16	1,52	1,69
	60 S	≤ 0,35	1,75	1,66	1,68	1,74
90–120 S			1,75	1,58	1,77	1,87
W ini. s.c.	≤ 0,35		2,0	2,26	2,03	1,96
Kontrola		≤ 0,35	≤ 0,35	≤ 0,35	≤ 0,35	≤ 0,35
Candur S	≤ 0,35		1,93	2,13	1,75	

Z tab. 3 wynika, że szczepione metodą aerozolu tchórzofretki lub norki pełną odporność na zakażenie parenteralne uzyskują dopiero po upływie 18 dni, tj. znacznie później niż po szczepieniu podskórnym. Natomiast przy zakażeniu kontaktowym, zbliżonym do warunków naturalnych, szczepionka zastosowana w aerozolu zapewniała po 8 dniach ochronę przed ciężkim zachorowaniem i śmiercią zwierząt. Tym niemniej występowały jeszcze stany podkliniczne (przejściowe posmutnienie, brak apetytu, osowiałość). Można więc wnioskować, że odporność u zwierząt szczepionych metodą aerozolu rozwija się wolniej niż po szczepieniu podskórnym. Jedną z przyczyn tej różnicy jest wchłonięcie znacznie mniejszej ilości antygenu niż to ma miejsce przy kontrolowanej wielkości dawki wprowadzonej parenteralnie. Ponadto można sądzić, że wirus wprowadzony w iniekcji nie musi pokonywać bariery ochronnej — związanej z mechanizmami miejscowej odporności w drogach oddechowych (20). Zjawisko 2–5-dniowego opóźnienia w wystąpieniu objawów chorobowych przy zakażeniu kontaktowym, w stosunku do zakażenia parenteralnego, było stale obserwowane u zwierząt kontrolnych i potwierdza zasadność powyższych wniosków.

W rozważaniach powyższych należy uwzględnić wyniki badań nad patogenezą nosówki (3) oraz wnioski z obserwacji terenowych wskazujące, że po stosowaniu w ogniskach nosówki szczepionek metodą aerozolu (Candur S) i w iniekcji (Canivac F), korzystniejsze wyniki uzyskiwano po parenteralnym szczepieniu (12).

Reasumując wyniki badań można stwierdzić, że przeprowadzone doświadczenia i obserwacje

Tab. 3. Czas wystąpienia odporności na zakażenie doświadczalne zjadliwym wirusem nosówki u tchórzofretek i nerek po aerozolowym i podskórnym zastosowaniu szczepionki Canivac F

Szczepienie		Zakażenie kontrolne					
Ilość i gatunek zwierząt	Sposób szczepienia	Dni po szczepieniu	Sposób zakażenia	Upadki z obj. nosówki	Krótkotrwała choroba	Zdrowe przez cały okres obserw.	Ostateczny wynik zakażenia ¹⁾
4 tch.	aerozol	2	kontakt	1	3	—	3/4
2 tch.	ini.	2	kontakt	—	—	2	2/2
4 tch.	aerozol	2	ini.	4	—	—	0/4
4 tch.	ini.	2	ini.	—	4	—	4/4
6 tch.	aerozol	8	kontakt	—	6	—	6/6
6 tch.	aerozol	8	ini.	2	4	—	4/6
2 tch.	ini.	8	ini.	—	—	2	2/2
4 norki	aerozol	16	kontakt	—	1	3	4/4
4 norki	aerozol	16	ini.	2	2	—	2/4
1 norka + 2 tch.	ini.	16	kontakt	—	—	3	3/3
1 norka + 2 tch.	ini.	16	ini.	—	—	3	3/3
4 tch.	aerozol	18	kontakt	—	—	4	4/4
4 tch.	aerozol	18	ini.	—	—	4	4/4
7 tch.	ini.	18	ini.	—	—	7	7/7
16 tch.	aerozol	21	ini.	—	—	16	16/16
7 tch.	ini.	21	ini.	—	—	7	7/7
7 tch.	aerozol	24	ini.	—	—	7	7/7
5 norek	aerozol	24	ini.	—	—	5	5/5
7 tch.	ini.	24	ini.	—	—	7	7/7
12 tch.	—	—	kontakt	12	—	—	0/12
15 tch.	—	—	ini.	15	—	—	0/15
1 norka	—	—	kontakt	1	—	—	0/1
3 norki	—	—	ini.	3	—	—	0/3

Objaśnienia: ¹⁾ w liczniku — ilość zwierząt zdrowych po zakończeniu obserwacji; w mianowniku — ilość zwierząt użytych do doświadczenia; tch. — tchórzofretka.

wykazały pełną nieszkodliwość zmodyfikowanej szczepionki Canivac F — zarówno po aerozolowym, jak i parenteralnym szczepieniu oraz, że przy prawidłowym stosowaniu preparat posiada właściwości uodporniające. Jednak po podaniu szczepionki w aerozolu odporność rozwija się wolniej i jej poziom jest bardziej zróżnicowany u poszczególnych osobników niż po szczepieniu parenteralnym.

Piśmiennictwo

- Ackermann O.: J. small Anim. Pract. 6, 171, 1965.
- Adam J.: Zarys statystyki medycznej. PZWL, Warszawa, 1968.
- Appel M. J. G.: Am. J. vet. Res. 30, 1167, 1969.
- Farrell R. K., Skinner S. F., Gorham J. R., Lauerman L. H.: Res. vet. Sci. 12, 392, 1971.
- Górska C.: Medycyna Wet. 24, 565, 1968.
- Górska C., Górski J.: Nowości weterynarii 7, 53, 1977.
- Górska C., Górski J.: Nowości weterynarii 7, 153, 1977.
- Górski J.: Nowości weterynarii 4, 429, 1974.
- Górski J.: Medycyna Wet. 31, 134, 1975.
- Górski J.: Pol. Arch. wet. 18, 23, 1975.
- Górski J., Arciuch B.: Biul. VI Zjazdu PTNW, Wrocław 1978, s. 686.
- Górski J., Górska C., Jastrzębski T., Motz J., Zdunkiewicz T., Zimowski A.: Biul. inf. Biowet. 23, 10, 1970.
- Górski J., Motz J., Górska C.: Medycyna Wet. 25, 649, 1969.
- Krukowski W.: Ocena kliniczna szczepionki p-ko nosówce Canivac F Aerozol (Biowet) 1978.
- Kull K. E., Svensson T., Ackermann O.: Nord. vet. Med. 22, 13, 1970.
- Motz J.: Opinia kliniczna i wyniki badań terenowych szczepionki Canivac F Aerozol produkcji Biowet Puławy 1978.
- Motz J., Górski J.: Biul. IV Zjazdu PTNW, Warszawa 1970, s. 176.
- Roszkowski J., Arciuch B.: Biul. VI Zjazdu PTNW, Wrocław 1978, s. 691.
- Stumpf J.: Veterinarstvi 25, 323, 1975.
- Tomasi T. B., Hienenstock J.: Adv. Immunol. 9, 48, 1968.
- Zwierzchowski J.: Opinia dotycząca nieszkodliwości i skuteczności aerozolowej szczepionki p-ko nosówce produkcji P.Z.P. Piowet. 1978.

Adres autorów: Michałowka 3/9, 24-100 Puławy.

Autorzy składają serdeczne podziękowanie CZPPGR za finansowanie zakupu nerek do doświadczeń, a Kierownictwu i Pracownikom fermy PGR w Kawęczynie za szczególną życzliwość i pomoc okazaną podczas wykonywania pracy.

Гурская Ц., Гурский Е. — Иммуногенные свойства аэрозольной вакцины против чумы для норок и гибридов лесного и белого африканских хорьков.

Разработали технологию выпуска вакцины против чумы — Canivac F Aerozol (Biowet — Пулавы). Препарат может применяться для норок и гибридов лесного и белого африканских хорьков аэрозольным методом или в инъекции.

Безвредность вакцины исследовали на ок. 100 гибридах лесного и белого африканских хорьков и ок. 100 норках. Эффективность препарата оценили на основании серологического исследования (реакцией серонейтрализации) и контрольной инфекции вакцинированных животных (проведенной парентерально или через присоединение животных, больных чумой, т.е. через контакт). Исследовали 228 проб крови, взятых через 62—150 дней после вакцинации, а инфекции вирулентным вирусом чумы

подвергли в аналогичное время 79 норок. Препаратом отнесения являлась вакцина Candur S für Nerze.

Установили, что вакцина, распыливаемая 40—45 сек. для 2 животных, находящихся в общей клетке, обеспечивает появление противотел и иммунитета у ок. 95% норок; после подкожного применения иммунитет и противотела появились у всех вакцинированных норок.

Исследуя время появления иммунитета после аэрозольной вакцинации, показали, что она развивается медленнее чем после подкожной вакцинации (исследование на 84 гибридах лесного и белого африканских хорьков и 15 норках). Констатировали, что иммунитет удерживается по крайней мере 5 месяцев. Однако, принимая во внимание высоту титра исследуемых в этот период противотел, следует считать, что норки остаются иммунными в течение I года.

Górska G., Górski J. — **Immunogenic properties of anti-distemper aerosol vaccine in minks and polecat-ferrets.**

Production technology of Canirac F Aerazol vaccine against canine distemper (Biowet — Puławy) has been

developed. This preparation can be used in aerosol and injection for minks and polecat-ferrets.

Its harmlessness has been examined on about 100 polecat-ferrets and about 1200 minks. The effectiveness of this preparation was estimated on the basis of serological examinations (seroneutralization reaction) and control infection of animals vaccinated peritoneally or by adding animals with canine distemper into cages, i.e., by contact. In all, 228 blood samples taken 62—150 days after vaccination were examined, and 79 minks were infected with the virulent virus in the same time. The vaccine Candur S für Nerze was a reference preparation.

It was found that the vaccine sprayed for 40—45 s two animals living in the same cage resulted in the formation of antibodies and immunity in about 95% of minks; the vaccine being used subcutaneously, immunity and antibodies were found in all minks vaccinated.

The examination of the time of the occurrence of immunity showed that it was developed slower after aerosol than subcutaneous vaccination (studies on 84 polecat-ferrets and 15 minks). Immunity was found to last at least for 5 months. However, taking into consideration the titer value of the antibodies studied in this period, it may be assumed that minks become immunized for about one year.

BEATA GRAS-WAWRZYŃIAK, EDWARD GRAWIŃSKI, WAWRZYŃIEC WAWRZYŃIAK

Parazytofauna węgorzycy *Zoarces viviparus* (L.) z Zatoki Puckiej

Z Zakładu Higieny Weterynaryjnej w Gdańsku

Węgorzyca — *Zoarces viviparus* (L.) jest jednym z bardziej pospolitych gatunków ryb należących do rodziny *Zoarcidae*. Występuje w wodach Północnego Atlantyku (13), u wybrzeży północno-zachodniej Europy od Morza Barentsa po Zatokę Biskajską. Często spotykana jest w cieśninach duńskich, Bałtyku aż po Zatokę Botnicką (4). Jest rybą denną, drapieżną, bytującą w wodach przybrzeżnych, płytkich, porośniętych roślinnością. Znosi duże różnice w stopniu zasolenia wód, dlatego może być spotykana w ujściach rzek i wodach przybrzeżnych. Pożywienie węgorzycy stanowią wszelkiego rodzaju zwierzęta morskie m.in. larwy ryb, mięczaki i skorupiaki (4, 13). Mięso tej ryby jest białe, jędrne, dobre w smaku, mimo to nie jest poławiane w celach przemysłowych lecz jako przylów. Nadaje się do spożycia po gotowaniu, smażeniu lub wędzeniu.

Badanie węgorzycy w akwenie Zatoki Fińskiej wykazało, że jest ona składnikiem pokarmowym ryb drapieżnych wyższego rzędu m.in. szczupaka *Esox lucius* L. (5).

Określeniem stopnia inwazji pasożytniczej ryb tego gatunku w zależności od stopnia zasolenia wód zajmowano się w ZSRR (10, 12) i RFN (9).

Badania parazytofauny u polskich wybrzeży prowadzone były w okresie przedwojennym w rejonie Helu i Gdańska (6, 7) oraz ostatnio w

niewielkim zakresie w akwenie Zatoki Gdańskiej (11).

Celem niniejszej pracy było wykazanie intensywności zarażenia węgorzycy w Zatoce Puckiej poszczególnymi gatunkami pasożytów, sprawdzenie występowania zmian okresowych i sezonowych w inwazji pasożytniczej u tej ryby oraz porównanie występującej parazytofauny węgorzycy z Zatoki Puckiej o zasoleniu 7‰ z danymi piśmiennictwa, określającymi rodzaje pasożytów spotykane w akwenach o wyższym stopniu zasolenia, dochodzącym do 33‰ (10).

Materiał i metody

Ryby do badań łowiono na głębokości 8,8 do 12,8 m w Zatoce Puckiej w rejonie Juraty i Kuźnicy w miesiącach od maja do października w okresie od 1976 do 1978 roku (ryc. 1). Długość całkowita ryb wynosiła od 24,5 do 39,0 cm, ciężar od 50 do 350 g. Ogółem przebadano 253 ryby. W badaniu każdej ryby sprawdzono makroskopowo: skórę, jamę gębową, przewód pokarmowy i jamę ciała, mikroskopowo: śluz ze skóry, oczy, skrzela, nerkę, wątrobę i mięśnie, ponadto przeglądano pod mikroskopem wyżej wymienione narządy w celu wykrycia obecności pierwotniaków i przywrm.

Stwierdzone nicienie utrwalano w formalinie. Kolcogłowy po uprzednim spłaszczeniu utrwalano w alkoholu 75%. Do określenia gatunku nicienie prześwietlano w mieszaninie alkoholu i gliceryny, a kolcogłowy barwiono w karminie akonowym i po odwodnieniu prześwietlano w kreozocie, następnie zamknięto w balsamie kanadyjskim. Wątrobę i jelita z