

Piśmiennictwo

1. Al-Mashat R. R., Taylor D. J.: Vet. Rec. 102, 19, 1983.
2. Anthony H. D.: J. Am. vet. med. Ass. 160, 97, 1972.
3. Anthony H. D.: Kansas Vet. 25, 7, 1971.
4. Bolton R. P., Sheriff R. J., Read A. E.: Lancet I, 383, 1980.
5. Brooks M. E., Epps H. E.: J. gen. Microbiol. 21, 144, 1959.
6. Buchanan R. E., Gibbons N. E.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, The Williams and Wilkins Company, Baltimore 1974.
7. Bull L. B.: J. comp. Path. 48, 21, 1935.
8. Burdon D. W.: Med. Lab. Sci. 33, 253, 1981.
9. Cakala S.: Choroby owiec, PWRIL, Warszawa 1975.
10. Coleman J. D., Hill J. S., Bray H. T., Armstrong D. A., Morgan C. O.: Vet. Med. small Anim. Clin. 70, 191, 1975.
11. Dinnoek F., Brown J. D., Arabi Y., Shingawa N., Keighley M. R., Alexander-Williams J., Burdon D. W.: Br. med. J. 1, 695, 1978.
12. Jensen R.: Diseases of Sheep. Lea Febiger, Philadelphia 1974.
13. MacLennan J. D.: Bact. Rev. 26, 177, 1962.
14. Marsh H., Welch H., Jungherr E.: cyt. wg poz. 23.
15. Pestl L.: Acta vet. hung. 15, 447, 1965.
16. Richards S. M., Hunt B. W.: Vet. Rec. 111, 22, 1982.
17. Roland F., Bourbon M., Szturm M.: Annls Inst. Pasteur, Paryż 73, 914, 1947.
18. Smith L. D.S.: Cornell Vet. 52, 62, 1962.
19. Smith L. D.S., Holdeman L. V.: The Pathogenic Anaerobic Bacteria. Ch. C. Thomas, Springfield, USA 1968.
20. Sterne M., Batty I.: Pathogenic Clostridia. Ed. Butterworths, London and Boston 1976.
21. Tataki H., Huet M.: Annls Inst. Pasteur, Paryż 84, 390, 1953.
22. Turner T. N.: Vet. Med. small Anim. Clin. 66, 803, 1971.
23. Vawter L. R.: Am. J. vet. Res. 3, 382, 1942.

Adres autora: prof. dr hab. Zygmunt Cygan, ul. Żelazowej Woli 6/13, 20-854 Lublin

Цыган З., Гузик З., Томашевская М. — Свойства и болезнетворная роль анаэробов *C. sordelli*, изолированных от овец

Исследовали свойства и болезнетворную роль 10 штаммов *C. sordelli* изолированных из мышц и паренхиматозных органов в чистой культуре от 2 7—8-недельных ягнят, а в смешанном составе с *C. novyi* А и *C. septicum* от 1 5-летней овцы. Все

штаммы вызывали у морских свинок характерные симптомы злокачественного отека. Также другие свойства этих анаэробов оказались типичными для вида *C. sordelli* (м.пр. уреазы +, лецитиназа +, индол +, ферментация глюкозы +, мальтозы + и глицерола +).

Исследуемое заболевание напоминала локализацией болезненных изменений злокачественный отек, описанный как т.наз. „большая голова”. Инфекции развивались у овец, показывающих локомоторную атаксию, возникающую на фоне дефицитов Cu, Mg и Se. Проникновение анаэробов делали возможными травмы животных с плегиями во время выполнения резких движений шей и неконтролированных ударов головой.

Cygan Z., Guzik Z., Tomaszewska M. — Properties and the function of pathogenic anaerobes — *C. sordelli* isolated from sheep

There were examined the properties and the function of 10 strains of *C. sordelli*, isolated from muscles and internal organs in a pure culture from two lambs, 7—8 weeks old, and in the mixed form with *C. novyi* A. and *C. septicum* from a sheep at the age of 5 years. All the strains induced in guinea pigs characteristic signs of a malign tumour. Other properties of those bacteria proved to be typical for *C. sordelli* (urease +, lecithinase +, indole +, fermentation of glucose, maltose and glycerol +). The disease reminded owing to the localization of the pathological changes a malign tumour, the illness described as big head. The disease developed in sheep with ataxy due to deficiency of Cu, Mg, and Se. The invasion of anaerobic bacteria in animals with paralysis of legs was possible through the wounds aquired by the sheep during rapid neck motions and uncontrolled strokes of head.

JANUSZ WAWRZKIEWICZ *, ELŻBIETA CZERWIŃSKA, ELŻBIETA ZDUN

Właściwości biologiczne atenuowanego szczepu wirusa nosówki namnażanego na fibroblastach kurzych w podłożu produkcji własnej

* Zakład Mikrobiologii Wydziału Weterynaryjnego AR, ul. Akademicka 12, 20-033 Lublin
Zakłady Przemysłu Błoweterynaryjnego, 24-100 Puławy-Michałówka

Nosówka, zaraźliwa choroba psów, lisów, norek, fretek i wilków wywoływana jest przez wirus (1, 2) z rodziny *Paramyxoviridae*. Występuje ona na całym świecie, powodując największe straty ekonomiczne w hodowli zwierząt futerkowych, szczególnie zaś norek. Zapobieganie polega głównie na szczepieniach ochronnych, zapoczątkowanych przez Laidlaw i Dunkina w 1928 r. (5). przy użyciu materiału zawierającego wirus inaktywowany formaliną. Obecnie produkowane szczepionki zawierają z reguły żywe szczepionki atenuowane, zaadaptowane do różnych hodowli komórek.

W Polsce od kilkunastu lat produkowana jest szczepionka przeciwko nosówce przy użyciu szczepu replikującego w hodowli fibroblastów zarodka kurzego, w płynie utrzymującym Parkera 199, dostarczonym przez Wytwórnę Surowic i Szczepionek w Lublinie. Podłoże to zawiera poza solami sodu, potasu, magnezu oraz

glukoza szereg aminokwasów, witamin i innych składników umożliwiających podtrzymanie metabolizmu komórkowego *in vitro*. Korzystną właściwością tego płynu jest zapewnienie względnie wvstandaryzowanych warunków hodowli, nieodzownych przy niektórych pracach naukowych lub przy pasażowaniu szczepów wzorcowych i macierzystych. Jednakże stosunkowo wysoka ocena takiego podłoża, przygotowanego ze składników importowanych, rzutuje niekorzystnie na koszt produkcji szczepionki i uzależnia wytwórcę od importu wielu związków chemicznych.

W celu obniżenia kosztów produkcji szczepionki przeciwko nosówce i uniezależnienia się od innych producentów, wykonano badania zmierzające do zastąpienia syntetycznego płynu Parkera 199 podłożem znacznie tańszym, o uproszczonym składzie, przygotowywanym we własnym zakresie.

Materiał i metody

W badaniach użyto następujących szczepów wirusa nosówki: a — szczep atenuowany Led. G., używany przez Biowet — Puławy do produkcji szczepionki przeciwko nosówce, 5-krotnie przepasażowany przez jednowarstwową hodowlę fibroblastów kurzych pokrytych płynem utrzymującym NP, b — szczep zjadliwy stosowany przez producenta do próby „challenge” (20% zawiesina śledziony tchórzofretki).

Przy zakładaniu hodowli komórek z zarodków kurzych wykorzystywano płyn Hanksa z dodatkiem 0,5% hydrolizatu albuminy mleka, 4% inaktywowanej surowicy cielecej oraz antybiotyków (penicyliny i streptomycyny) w ilościach standardowych.

Podłoża utrzymujące stanowiły:

1. płyn Parkera 199 produkcji Lubelskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek,
2. płyn NP o składzie:

| | |
|--|----------|
| NaCl | 6,8 g |
| KCl | 0,4 g |
| MgSO ₄ × 7H ₂ O | 0,2 g |
| Glukoza | 1,0 g |
| NaH ₂ PO ₄ × 1H ₂ O | 0,13 g |
| CaCl ₂ (bezwodny) | 0,2 g |
| NaHCO ₃ 2,2% roztwór | 70,0 ml |
| czerwień fenolowa 0,1% | 10,0 ml |
| hydrolizat albuminy mleka | 5,0 g |
| ekstrakt drożdżowy | 0,1 g |
| woda destylowana | 920,0 ml |

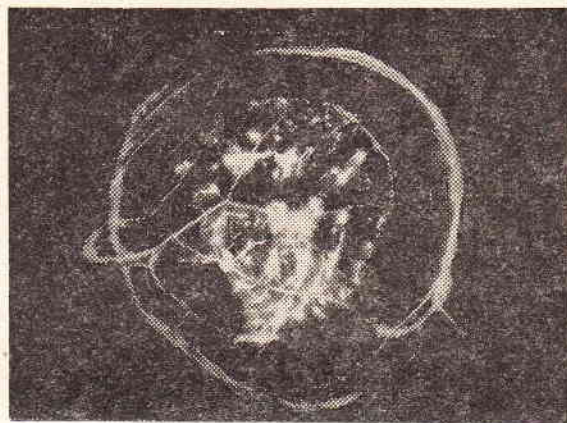
Liofilizację szczepionki przeprowadzono w aparacie firmy Usifroid stosując osłaniacz kazeinowo-sacharozowy (kazeina rozpuszczalna 2%, sacharoza 10%, glutaminian sodu 1%). Miano ID₅₀ badanych szczepów i szczepionki określano na 8-dniowych zarodkach kurzych; po 5 dniach inkubacji schładzano je w temp. 4°C, zbierano błony kosmówkowo-omoczniove i oceniano pod względem występowania charakterystycznych zmian chorobowych. ID₅₀ obliczano wg metody Reed-Muencha (6).

Wyniki i omówienie

Dane doświadczalne zebrane w tab. 1 wskazują, że miana wirusa Led. G (uprzednio 3-krotnie przepasażowanego przez jednowarstwową hodowlę fibroblastów kurzych w syntetycznym płynie utrzymującym Parkera 199) utrzymywały się na jednakowym, stosunkowo wysokim poziomie, niezależnie od rodzaju zastosowanego w doświadczeniu podłoża utrzymującego. Minimalne różnice w mianach wirusa, występujące niekiedy w poszczególnych seriach, zarówno przy namnażaniu zarazka w badanym jak i kontrolnym podłożu, wahały się w granicach błędu i nie upoważniały do preferowania któregośkolwiek podłoża użytego do oceny. Zaobserwowano jednak, że efekt cytopatyczny w hodowli fibroblastów, utrzymywanych w środowisku podłoża NP — tj. nowo zastosowanego — pojawiał się nieco wcześniej i był wyraźny przy użytym inokulum (ok. 10^{2,0} TCID₅₀/100 000 komórek) po 76—96 godzinach. Ponadto po inokulacji tym szczepem zarodków kurzych notowano dobrze widoczne zmiany na błonach kosmówkowo-omoczniowych, co znacznie ułatwiło określenie miana wirusa (ryc. 1). Wyniki te uzasadniały prowadzenie dalszych badań w kierunku określenia immunogenności i awirulentności badanego szczepu. W tym celu wyprodukowano szczepionkę, którą oceniono

Tab. 1. Koncentracja cząstek wirusowych szczepu atenuowanego namnażanego *in vitro* w zależności od rodzaju płynu utrzymującego

| Nr badania | Miano wirusa nosówki (ID ₅₀ /ml). Płyn Parkera 199 | Miano wirusa nosówki (ID ₅₀ /ml). Płyn zastępczy NP |
|------------|---|--|
| 1 | 10 ^{3,9} | 10 ^{4,0} |
| 2 | 10 ^{3,9} | 10 ^{4,0} |
| 3 | 10 ^{4,05} | 10 ^{3,95} |
| 4 | 10 ^{4,1} | 10 ^{4,0} |
| 5 | 10 ^{4,0} | 10 ^{4,0} |
| 6 | 10 ^{3,95} | 10 ^{3,95} |
| 7 | 10 ^{3,9} | 10 ^{3,9} |
| 8 | 10 ^{4,0} | 10 ^{4,0} |
| 9 | 10 ^{4,0} | 10 ^{4,0} |
| 10 | 10 ^{3,95} | 10 ^{3,9} |



Ryc. 1. Ogniskowe zmiany chorobowe na błonie kosmówkowo-omoczniovej zarodka kurzego zakażonego wirusem nosówki

Tab. 2. Ocena immunogenności szczepionki na tchórzofretkach

| Nr serii szczepionki | Liczba zwierząt uodpornianych s.c. | Dawka | Procent uodpornionych zwierząt |
|---------------------------|------------------------------------|-------|--------------------------------|
| 90382 | 3 | 1/2 | 100 |
| | 2 | 1 | 100 |
| | 2 | 4 | 100 |
| Kontrola (nie szczepione) | 3 | — | 0 |
| 100382 | 3 | 1/2 | 100 |
| | 2 | 1 | 100 |
| | 2 | 4 | 100 |
| Kontrola (nie szczepione) | 3 | — | 0 |
| 110482 | 3 | 1/2 | 100 |
| | 2 | 1 | 100 |
| | 2 | 4 | 100 |
| Kontrola (nie szczepione) | 3 | — | 0 |

Objaśnienie: zwierzęta szczepione obserwowano przez 4 tygodnie po dawce „challenge”.

na trzech grupach tchórzofrettek: grupie pierwszej podano po $\frac{1}{2}$ dawki szczepionki przeznaczonej dla norki (0,5 ml szczepionki), drugiej — po 1 dawce (1 ml) i 3-ciej po 4 dawki (4 ml). Dodatkowe 3 tchórzofretki stanowiły grupę kontrolną. Próba „challenge” 10 LD₅₀ wykonana po 3 tygodniach od immunizacji nie spowodowała pojawienia się jakichkolwiek objawów chorobowych u zwierząt uodpornianych nawet najmniejszą użytą dawką szczepionki. Natomiast zwierzęta kontrolne (nie szczepione) zachorowały i padły wśród typowych oznak chorobowych w ciągu 9—10 dni od zakażenia (tab. 2).

Powyższe badania powtórzone 2-krotnie z kolejnymi seriami szczepionki wykazały pełną skuteczność preparatu przy braku klinicznie uchwytanych objawów ubocznych nawet po zastosowaniu 4-krotnie wyższej dawki od zalecanej dla tchórzofrettek. Równolegle wykonywano standardową ocenę nieszkodliwości preparatu na myszkach i świnkach morskich. Wyniki te potwierdziły założenia, że ewentualny wariant szczepu produkcyjnego, łatwo namnażający się na fibroblastach zarodka kurzego w środowisku płynu utrzymującego NP, cechuje się dobrymi właściwościami immunogennymi. Pozytywne wyniki badań laboratoryjnych upoważniły do szczepień w warunkach terenowych. Do uodpornienia 700 norek i 400 tchórzofrettek w rejonie, gdzie notowano przypadki nosówki, użyto czterech serii szczepionki, po uzyskaniu atestu kontroli państwowej. U szczepionych zwierząt nie obserwowano ani zachorowań, ani jakichkolwiek objawów ubocznych.

Następnym etapem badań była ocena trwałości preparatu liofilizowanego w osłaniaczu kazeinowo-sacharozowym. Stwierdzono, że 14 miesięczny okres przetrzymywania szczepionki w temperaturze 4°C nie wpływał ujemnie na miano wirusa. W przypadku bowiem trzech badanych serii (Nr 90383, 100382, 110382) średnie miano z 3 ampulek szczepionki kształtowały się następująco: 10^{3,8}, 10^{4,0}, 10^{4,0} ID₅₀ w stosunku do 10^{3,05}, 10^{4,0}, 10^{4,0} ID₅₀ miano wyjściowego, tj. bezpośrednio po liofilizacji.

Zasadnicza wartość szczepionek żywych, zawierających szczepy atenuowane, polega na możliwości zastosowania małej dawki zarazka, który namnażając się we wrażliwym organizmie indukuje na ogół wysoką i długotrwałą odporność. Niemniej jednak użyte inokulum nie może być zbyt małe, gdyż wówczas proces uodporniania przedłuża się, a stan niewrażliwości nie daje pełnego zabezpieczenia przed infekcją żywym, zjadliwym zarazkiem. W przypadku wirusa nosówki przyjmuje się, że liczba cząstek wirusa atenuowanego szczepu Onderstepoort, namnażanego na fibroblastach kurzych nie powinna być niższa od 1000 ID₅₀ wirusa w przeliczeniu na jedną dawkę szczepionki. Według danych firma Wellcome (3) 962PFU wirusa wystarcza do indukcji 100 PD₅₀ (PD = protective

dose), warunkujących minimalny stan odporności. W przypadku szczepu Led. G miano wirusa było około 10-krotnie wyższe (10^{3,8}—10^{4,0} ID₅₀), zapewniające indukcję odporności wysokiego rzędu, potwierdzoną w próbach laboratoryjnych na tchórzofretkach oraz szczepieniami terenowymi na norkach i tchórzofretkach. Powyższe badania mają duże znaczenie z praktycznego punktu widzenia, umożliwiając bowiem zachowanie pełnej skuteczności szczepionki nawet przy pewnym spadku liczby cząstek zakaźnych. Nie upoważniają one natomiast do 5—10-krotnego obniżenia miana wirusa, gdyż szczep używany do produkcji przez firmę Wellcome może cechować się nieco silniejszymi właściwościami immunogennymi od szczepu Led. G, co jednak jest mało prawdopodobne w świetle porównawczych badań nad tymi szczepami prowadzonymi przez Górską (4). Niemniej jednak precyzyjną odpowiedź na to pytanie można by uzyskać dopiero po przeprowadzeniu dodatkowych badań i porównaniu stopnia kształtowania się procesu odpornościowego u szczepionych zwierząt jednym i drugim preparatem.

Dodanie do wirusa liofilizowanego osłaniacza kazeinowo-sacharozowego przedłużyło w znacznym stopniu zachowanie żywotności szczepu, a tym samym i czas składowania szczepionki. Stanowi on alternatywny zawieszalnik, konkurencyjny w stosunku do obecnie stosowanego preparatu pod nazwą DSG-72.

Wnioski

1. Zastosowanie płynu utrzymującego, oznaczonego symbolem NP, daje wymierne efekty ekonomiczne, wynikające z różnicy cen między płynem Parkera 199 a podłożem NP.
2. Płyn NP, przygotowany we własnym zakresie, uniezależnia producenta szczepionki od zakupu syntetycznego płynu Parkera 199, którego składniki w większości są importowane z krajów I lub II obszaru płatniczego.
3. Szczepionka wyprodukowana na hodowli jednowarstwowej fibroblastów kurzych, utrzymywanych *in vitro* w płynie NP, cechuje się dobrą immunogennością, trwałością i awirulentnością.

Piśmiennictwo

1. Carre H.: cyt. wg Handbuch der Virusinfektionen bei Tieren., Gustav Fischer Verlag, Jena, 1968.
2. Dunkin G. W., Laidlaw P. P.: J. comp. Path. 39, 213, 1926.
3. Epjvax DHL, The Wellcome Foundation Ltd., 1979.
4. Górska Cz.: Właściwości biologiczne szczepów wirusa nosówki zaadaptowanych do hodowli komórek — ze szczególnym uwzględnieniem ich zdolności immunogennych. Praca dokt., Puławy—Lublin, 1971.
5. Laidlaw P. P., Dunkin G. W.: J. comp. Path. 41, 1, 1928.
6. Reed L. J., Muench H.: Am. J. Hyg. 27, 493, 1938.

Adres autora: prof. dr hab. Janusz Wawrzekiewicz, ul. B. Chrobrego 1/19, 20-011 Lublin

Вавжкевич Я., Червиньская Э., Здун Э. — Биологические свойства аттенюированного штамма вируса чумы собак, намноженного в куриных фибро-

блстах в питательной среде собственного производства

Авторы провели исследования, направленные на замещение относительно дорогой жидкости Паркера 199, изготавливаемой Люблинской фабрикой сывороток и вакцин в Люблине из реактивов, в значительной степени импортированных, питательной жидкостью NP, изготавливаемой собственными силами. Отмечено, что новая среда NP может полностью заместить синтетическую жидкость Паркера 199, а вакцина против чумы собак, изготовленная на фибробластах куриного зародыща с жидкостью NP, отличается устойчивостью и хорошими иммуногенными свойствами, а также авирулентностью.

Wawrzkiwicz J., Czerwińska E., Zdun E. — Biological properties of distemper attenuated strain propagated in chick fibroblasts in the medium of own production

The examinations carried out by the authors were designed to replace a relatively expensive Parker's medium, prepared by Lubelska Wytwórnia Surowic i Szczepionek in Lublin of the compounds mainly imported, by a medium NP. It was found that the new medium NP could be used instead of Parker's medium 199, and the vaccine against distemper produced on chick embryo fibroblasts proved to be constant, was highly immunogenic and safe for animals vaccinated.

MICHAŁ KONOPA, STANISŁAW KLIMENTOWSKI, MICHAŁ MAZURKIEWICZ

Одповідь immunologiczna u myszy zakażonych różnymi szczepami *Listeria monocytogenes**

Katedra Epizootiologii i Klinika Chorób Zakaźnych Wydziału Weterynaryjnego AR, pl. Grunwaldzki 45, 50-366 Wrocław

Mechanizm powstawania oraz stopień odpowiedzi immunologicznej u zwierząt zakażonych *L. monocytogenes* nie zostały jeszcze w pełni wyjaśnione. Uwzględniając fakt zachodzącej interakcji oraz uzupełniania się w swoich funkcjach immunologicznych limfocytów B i T (5, 6) można przyjąć, że zarówno odpowiedź komórkowa, jak też humoralna odgrywają tu istotną rolę, lecz w różnym okresie po zakażeniu. Odporność komórkowa, wyrażająca się stanem nadwrażliwości typu późnego, w której zasadniczą rolę odgrywają limfocyty T, limfokiny oraz makrofagi wydaje się mieć decydujące znaczenie w pierwszym okresie po zakażeniu *L. monocytogenes* (1, 3, 10, 12, 13, 25, 26). Natomiast rozwinięcie się w pełni mechanizmów odpowiedzi typu humoralnego jest widoczne w późniejszym okresie infekcji. Wiadomo również, że swoista odpowiedź immunologiczna organizmu może wytwarzać się ze znacznym nierez opóźnieniem. Uzależnione to jest od stopnia odporności nieswoistej ustroju, a zwłaszcza sprawności jego układu neuro-hormonalnego, siateczkowo-śródbłonkowego itp. Ponadto dynamika i charakter odpowiedzi immunologicznej organizmu w przypadku zakażeń bakteryjnych zależne są od właściwości drobnoustrojów, a przede wszystkim od ich zjadliwości.

Celem niniejszych badań było określenie zmian ilościowych w populacji limfocytów B i T oraz ocena właściwości komórek fagocytarnych u myszy zakażonych szczepami *L. monocytogenes* o różnej zjadliwości.

Materiał i metody

Do badań użyto 3 grup liczących po 60 myszy szczepu Balb/c, samców w wieku 3—4 miesięcy i masy ciała około 15 g, pochodzących z Ośrodka Hodowli Zwierząt Doświadczalnych Instytutu Immunologii i Terapii Doświadczalnej PAN we Wrocławiu.

*) Praca wykonana w ramach Problemu MR.II.17.

Pierwszą grupę stanowiły myszy zakażone podskórnie słabozjadliwym szczepem *L. monocytogenes* (1 Seeliger — serotyp 1). Myszy zakażano podając każdej po 0,15 ml zawiesiny bakterii o gęstości 10^8 /ml. Drugą grupę myszy zakażano identycznie zjadliwym szczepem *L. monocytogenes* (1 Gray — serotyp 1). Natomiast grupę trzecią — kontrolną stanowiły myszy niezakażone.

Szczepy do zakażeń przygotowywano wysiewając *L. monocytogenes* na agar tryptozowy. Po 72 godz. inkubacji w temperaturze 28°C i 24 godz. w temperaturze 4°C splukiwano bakterie taką ilością płynu fizjologicznego, aby uzyskać wymaganą gęstość zawiesiny bakteryjnej.

Po upływie 2, 5, 6, 8, 9, 12 i 14 dni po zakażeniu *L. monocytogenes* po 6 wybranych losowo z grupy myszy uśmiercano przez dekapitację. Na materiale tym określano zdolność wewnątrzkomórkowego zabijania bakterii przez granulocyty przy użyciu testu z błękitem nitrotetrazoliowym (NBT) wg metody Parka i wsp. (24) w modyfikacji Nikolańczuk (19) oraz aktywność fagocytną komórek izolowanych z węzłów chłonnych za pomocą odczynu z czerwieńią obojętną (21). Równocześnie określano dynamikę zmian ilości limfocytów B i T identyfikując limfocyty B w węzłach chłonnych testem rozetowym EAC (2, 12, 21), a limfocyty T testem cytotoksycznym z ATS (9, 22). Ponadto określano ilość limfocytów T we krwi, węzłach chłonnych i śledzionie, metoda cytoenzymatyczną Muellera i wsp. (17). U badanych myszy wykonywano również każdorazowo leukogram.

Testy NBT oraz cytoenzymatyczny wykonano na rozmazach krwi sporządzonych bezpośrednio po zglądzeniu myszy. Natomiast do wykonania testów na komórkach izolowanych z węzłów chłonnych pachowych i pachwinowych oraz śledziony uzyskiwano komórki w sposób następujący. Po rozdrobnieniu narządów komórki przepłukiwano przez podwójnie złożony filtr do krwi za pomocą płynu Hanksa z 10% dodatkiem inaktywowanej surowicy cielej. Po dwukrotnym przepłukaniu komórek przez 6 min. przy 250 g supernatant usuwano, a osad komórkowy uzupełniano do takiej objętości, aby uzyskać właściwą gęstość zawiesiny komórkowej do poszczególnych testów. Żywotność komórek sprawdzana 2% roztworem błękitu trypanu wynosiła $91,0 \pm 5,1\%$.

Uzyskane dane liczbowe z poszczególnych testów opracowano statystycznie przy użyciu metody analizy wariacji w układzie wieloczynnikowym oraz nowego wielokrotnego testu rozstępu (27).