

a średnia różnica wynosiła 0,50 mmol/l. Różnice pomiędzy stężeniami akt.  $\text{HCO}_3^-$  nie były istotne statystycznie.

Przedstawione wyniki dowodzą, że przechowywanie prób krwi w odpowiednich warunkach przez okres 24 godzin nie wywiera ujemnego wpływu na wartości uzyskiwanych wyników. Do warunków tych należy zaliczyć przede wszystkim natychmiastowe schłodzenie zakonserwowanych heparyną prób i ich przetrzymywanie podczas transportu do laboratorium w torbie chłodniczej w temperaturze od 0 do  $+4^\circ\text{C}$ , a następnie w lodówce w temperaturze  $+5^\circ\text{C}$ . Stwarza to możliwości wydłużenia czasu przetrzymywania prób krwi w niskiej temperaturze do  $+5^\circ\text{C}$  przez okres dłuższy niż zalecali

Chyla i wsp. (2) oraz Krokavec i wsp. (4), bo do 24 godzin.

#### Piśmiennictwo

1. Banaszek F.: Teoretyczne podstawy badania równowagi kwasowo-zasadowej krwi dla potrzeb fizjologii wysiłku fizycznego i sportu. Skrypt AWF w Poznaniu, nr 67, 1986.
2. Chyla M., Buďačová D., Šterbaková A.: Vet. Med. (Praž) 32, 181, 1987.
3. Koziołowski A., Orlowska K.: Badania czynnościowe narządu oddechowego, red. Czyżyk A.: Badania czynnościowe w klinice chorób wewnętrznych, PZWL, Warszawa 1969, s. 70.
4. Krokavec M., Šimó K., Martinko A.: Vet. Med. (Praž) 32, 145, 1987.
5. Pinkiewicz E.: Podstawowe badania laboratoryjne w chorobach zwierząt. PWRiL, Warszawa 1971, s. 96.
6. Szafran H., Owsinski J., Szafran Z.: Przegl. lek. 30, 747, 1973.

Adres autora: dr Elżbieta M. Heydrych, Os. Kosmonautów 18 m. 125, 61-641 Poznań

DANUTA CZERNOMYSY-FUROWICZ, ANTONI J. FUROWICZ

## Porównanie testu redukcji błękitu nitrotetrazoliowego przez obojętnochłonne granulocyty owcze w metodach cytochemicznej i spektrofotometrycznej\*)

Katedra Immunologii i Mikrobiologii Wydziału Zootechnicznego AR,  
ul. Doktora Judyma 24, 71-460 Szczecin

### Summary

#### Evaluation of nitroblue tetrazolium reduction by sheep polymorphonuclear neutrophils in cytochemical and spectrophotometric techniques

Reduction of NBT by polymorphonuclear neutrophils was determined by means of two techniques: cytochemical according to Park and spectrophotometric according to Raman and Poland. Thirty two tests were performed on healthy lambs. A considerable correlation was observed between the results obtained using these two techniques. The authors suggest that spectrophotometric technique is easier, more objective and requires less blood for testing.

Granulocyty obojętnochłonne, określane również jako neutrofile lub komórki PNL (Polymorphonuclear Neutrophil Leukocytes), reprezentują pierwszą linię obrony przeciwzakaznej. Biorąc udział w fagocytozie, pierwsze pojawiają się w miejscu uszkodzenia tkanek (10, 15). W procesie likwidowania drobnoustrojów, dzięki obecności swoistych receptorów, współdziałają z dopełniaczem ( $\text{C}_3\text{e}$ ) i immunoglobulinami (Fc) (2, 12). Ważną rolę w ich fagocytarnej stymulacji odgrywają limfokiny: CF (Chemotactic Factor) i LIF (Leukocyte Inhibitory Factor) (14). Obojętnochłonne granulocyty charakteryzują się zdolnością redukcji błękitu nitrotetrazoliowego (NBT). Fakt ten został wykorzystany w diagnostyce laboratoryjnej do oceny czynności i wykrywania zaburzeń neutrofilii oraz do różnicowania zakażeń wirusowych, bakteryjnych i chorób nowotworowych (6, 8, 9, 18). Wprowadzona przez Parka (8) metoda opiera się na mikroskopowej ocenie odsetka granulocytów zawierających zredukowany barwnik. Za pomocą tej metody określono we wcześniejszych badaniach czynności granulocytów u cieląt chorych na enzootyczną bronchopneumonię, stymulowanych *P. acnes* (t. 2) CN 5936 oraz u owiec z endemiczną formą listeriozy, leczonych tym preparatem. W obu przypadkach odnotowano statystycznie istotny wzrost liczby komórek redukujących NBT (4, 5).

Metoda spektrofotometryczna polega na ekstrahowa-

niu zredukowanego barwnika rozpuszczalnikiem organicznym (dwumetyloformamidem) i pomiarze spektrofotometrycznym (1, 11). Wykazuje ona korelację z metodą cytochemiczną. Jest jednak dokładniejsza i szybsza. Dane te dotyczą jednak badań wykonywanych z granulocytami ludzkimi (3, 6) oraz bydłowymi (13).

Celem badań własnych była ocena testu redukcji błękitu nitrotetrazoliowego przez granulocyty owcze w metodach cytochemicznej i spektrofotometrycznej.

### Materiał i metody

Badania przeprowadzono równolegle 2 metodami (cytochemiczną i spektrofotometryczną) na 32 klinicznie zdrowych jagniętach rasy merynos, będących w wieku 4 tygodni. Oznaczenia wykonano we krwi żyłnej heparynizowanej, używając do tego celu plastikowych probówek.

Metoda cytochemiczna wg Parka (8). Do 0,1 ml krwi dodawano 0,1 ml 0,2% roztworu NBT. Tak przygotowaną próbę inkubowano w  $37^\circ\text{C}$  przez 30 min. Następnie sporządzono rozmazy utrwalane alkoholem metylowym i barwione przez 10 min. barwnikiem o następującym składzie: zieleń metylowa — 0,015 g, pyromina — 0,25 g, fenol krystaliczny — 0,5 g, alkohol etylowy — 0,5 ml, woda destylowana — 100 ml.

Granulocyty uważano za NBT dodatni, o ile wielkość złożeń przewyższała ziarnistość granulocytów obojętnochłonnych. Ustalono procent komórek formazanowych, licząc w mikroskopie świetlnym co najmniej 200 granulocytów.

Metoda spektrofotometryczna wg Ramana i Polanda (11). Do 0,2 ml 0,1% roztworu NBT dodawano 0,2 ml pełnej krwi żyłnej. Próbę inkubowano w cieplarni o temp.  $37^\circ\text{C}$  przez 30 min., a następnie przez dalsze 30 min. w temp. pokojowej ( $20^\circ\text{C}$ ). Równolegle z próbą badaną wykonywano próbę kontrolną („zerową”), dodając zamiast roztworu NBT, bufor fosforanowy o  $\text{PH} = 6,8$ . Po inkubacji, do plastikowej probówki przenoszono po 0,05 ml mieszaniny krwi i barwnika i ekstrahowano w 1 ml NN-limetyloformamidu (DMF). Analogiczne czynności wykonywano z próbami kontrolnymi. Następnie obie próby odwirowywano (2000 obr./min przez 10 min.) i mierzono gęstość optyczną wobec DMF przy długości fali 600 nm. Równolegle oznaczano ogólną ilość leukocytów oraz wykonywano leukogram.

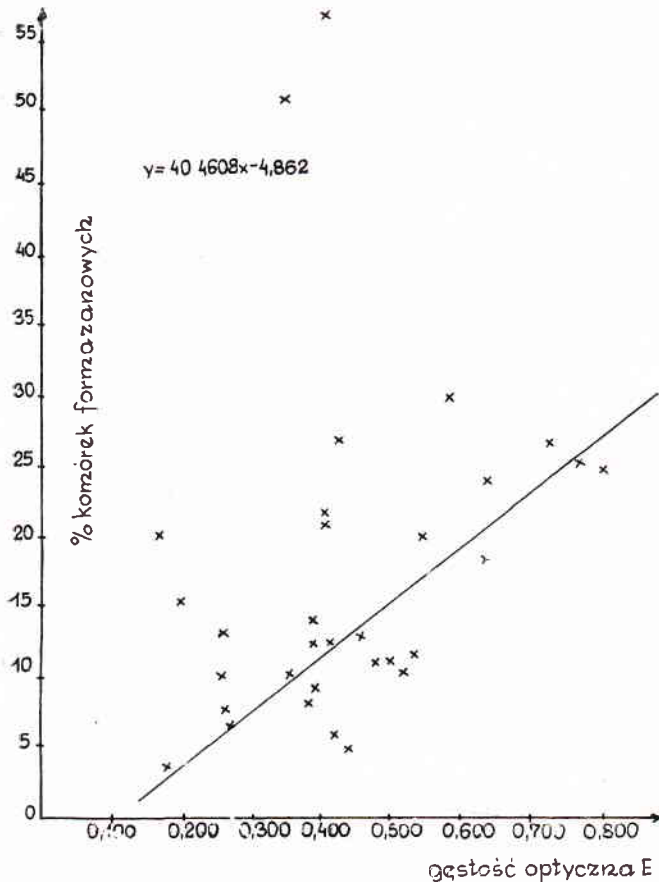
### Wyniki i omówienie

Wartość gęstości optycznej poszczególnych prób przeliczano na 10 000 granulocytów obojętnochłon-

\* Badania wykonano w programie CPBP 05.06.4.

Tab. 1. Średnie wartości wyników testów NBT

Metoda	n	$\bar{x}$	s
Cytochemiczna (‰)	32	22,5	± 18,281
Spektrofotometryczna (gęstość optyczna)	32	0,402	± 0,26831
Spektrofotometryczna (przeliczona na ‰)	32	21,8	± 13,193



Ryc. 1. Zależność odsetka komórek formazanowych od gęstości optycznej badanej próby

nych. W tym celu określano ogólną ilość leukocytów i leukogram. Uwzględniając rozcieńczenie krwi i objętości dokonano ostatecznego przeliczenia wg wzoru (3):

$$E_{10\ 000} = \frac{E_b - E_o}{L \times S} \times 40\ 000$$

$E_{10\ 000}$  — gęstość optyczna na 10 000 komórek

$E_b$  — gęstość optyczna próby badanej wyrażona w ‰

$E_o$  — gęstość optyczna próby kontrolnej wyrażona w ‰

L — liczba krwinek białych w 1 ml

S — odsetek granulocytów obojętnochłonnych (segmentów).

Uzyskane wyniki przedstawiono w tabeli 1.

Obliczono również współczynnik korelacji  $r$  dla obu metod i wykreślono krzywą regresji. Analiza danych wykazała daleko idącą zbieżność między porównywanymi metodami. Współczynnik korelacji  $r = 0,845$ , jest więc zbliżony do jedności, co oznacza, że istnieje ścisły związek między analizowanymi metodami. Ponadto wykazano, że istnieje statystycznie istotny ( $p \leq 0,01$ ) związek pomiędzy gęstością optyczną próby badanej a wartością odsetkową komórek formazanowych. Różnica pomiędzy wartościami średnimi może być dziełem przypadku, a może też wynikać z subiektywnej oceny odsetka

granulocytów NBT-dodatnich. Na podstawie obserwacji własnych i danych literaturowych (11, 16, 17) można założyć, że powodem rozbieżności wyników pomiędzy obiema metodami jest często fałszywie dodatnie bądź też ujemne określenie rezultatów cytochemicznego testu NBT. Wykres linii regresji (ryc. 1) i określające ją równanie:  $y = 40,4608x - 4,862$  daje swobodną możliwość przechodzenia z gęstości optycznej do bardziej komunikatywnej wartości odsetka komórek formazanowych.

Analizując metodę spektrofotometryczną należy stwierdzić, że DMF jest dobrym rozpuszczalnikiem organicznym formazanu NBT, który w sposób powtarzalny i całkowity przechodzi do DMF (11). Powtarzalność wyników związana jest również ze stałym czasem wykonywania badania od momentu pobrania krwi. Proponowana metoda określania granulocytów NBT-dodatnich wydaje się być metodą czulszą (mniejszy błąd popełniany przy określaniu gęstości optycznej na speku) aniżeli metoda cytochemiczna i pomimo zastosowania dwóch dodatkowych badań (określenie ogólnej liczby leukocytów i odsetka granulocytów obojętnochłonnych), jest godna rozpropagowania, tym bardziej, że oba te badania często są wykonywane w diagnostyce laboratoryjnej w sposób rutynowy.

Reasumując należy stwierdzić, że w celu oceny testu redukcji błękitu nitrotetrazoliowego przez obojętnochłonne granulocyty owce można zalecić metodę spektrofotometryczną, która jest bardziej czuła i dokładna aniżeli cytochemiczna.

#### Piśmiennictwo

1. Bashner R. L., Nathan G. D.: New Engl. J. Med. 287, 971, 1968.
2. Battisto J. R., Gautam S. C.: Cell-mediated Immunity and Mediators. w: Medical Microbiology, 79, red. S. Baron, Addison-Wesley Pub. Comp. Inc., California Reading, Massachusetts 1983.
3. Dębczyński W., Pietruszka Z.: Pol. Tyg. Lek. 44, 332, 1989.
4. Furowicz A. J., Gos Z., Grupiński T., Czernomysy-Furowicz D.: Medycyna Wet. 45, 80, 1989.
5. Furowicz A. J., Zyska W., Czernomysy-Furowicz D., Grupiński T.: Pol. Archiwum Wet. w druku.
6. Kowal E., Tarasiewicz F.: Pol. Tyg. Lek. 32, 1175, 1977.
7. Outteridge P. M.: Veterinary Immunology. Academic Press, London, 1985.
8. Park B. H.: Lancet 2, 532, 1968.
9. Park B. H.: J. Pediatr. 78, 376, 1971.
10. Quie P. G., Goldman A. S.: Functions of Phagocytes, w: Medical Microbiology, 97, red. S. Baron, Addison - Wesley Pub. Comp. Inc., California Reading, Massachusetts 1986.
11. Ramon U., Poland R. L.: Ped. Res. 9, 334, 1975.
12. Rosenthal A. S., Shevach E. M.: Function of Macrophages in Antigen Recognition by Guinea Pig T Lymphocytes. w: Cellular Immunity, 309, red. V. L. Sato, M.L. Geffer, Addison-Wesley Pub. Comp., London 1982.
13. Salwa A.: Medycyna Wet. 36, 737, 1980.
14. Scala G., Oppenheim J. J.: Relationship of Human Interleukin I to Antigen - presenting Cell Functions of a Variety of Human Accessory Cells. w: Lymphokines, 39, red. P. Edgar, Academic Press, New York 1985.
15. Shevach E. M.: Macrophages and other Accessory Cells. w: Fundamental Immunology, 71, red. E. W. Paul, Raven Press, New York 1983.
16. Sychłowy A.: Ped. Pol. 2, 169, 1975.
17. Sychłowy A., Lukas A.: Pol. Tyg. Lek. 33, 45, 1978.
18. Szczepański Z., Sychłowy A.: Pol. Tyg. Lek. 27, 1548, 1972.

Adres autora: mgr Danuta Czernomysy-Furowicz, ul. Armii Czerwonej 16 m. 2, 70-460 Szczecin

**GOGOLEWSKI R. P., COOK R. W., O'CONNELL C. J.: Serotypy Streptococcus suis wywołujące choroby warchlaków. (Streptococcus suis serotypes associated with diseases in weaned pigs).** Aust. vet. J. 67, 202-204, 1990 (6)

Streptococcus suis wyizolowano od padłych prosiąt z 90 ognisk posocznicy i zapalenia opon mózgowych u odsadzonych prosiąt. Badania obejmowały 13 ferm, w których przebywało od 30 do 2500 zwierząt. Piętnaście izolatów wyosobnionych w 7 ogniskach zidentyfikowano jako *S. suis* typ 9, 3 izolaty pochodzące z dwóch ognisk zidentyfikowano jako *S. suis* typ 2. Trzy szczepy *S. suis* typ 2 i jeden szczep *S. suis* typ 3 pochodziły od świń z objawami odoskrzelowego zapalenia płuc. Wyosobnienie *S. suis* z przypadków odoskrzelowego zapalenia płuc wskazuje na udział tego drobnoustroju w etiologii choroby.

G.