

# PRAKTYKA LABORATORYJNA

MARIAN GRUNDBOECK

## Szybka metoda hematologicznego rozpoznawania białaczki u bydła

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

Jedyną powszechnie uznaną i stosowaną metodą wczesnego rozpoznawania białaczki u bydła jest badanie hematologiczne. Polega ono na oznaczeniu poziomu limfocytów w krwi obwodowej z ewentualnym uwzględnieniem zmian morfologicznych w komórkach tego układu. Badanie punktatów węzłów chłonnych, badanie szpiku, metody serologiczne, wykrywanie w moczu fermentów obronnych Abderhaldena i inne techniki odgrywają tylko pomocniczą rolę, względnie nie mają praktycznego znaczenia.

Określanie bezwzględnej ilości limfocytów, odgrywające pierwszorzędą rolę w diagnostyce białaczki związane jest z trudnościami, zwłaszcza w badaniach masowych. Klasyczna metoda, polegająca na rozcieńczeniu krwi w mieszalniku i liczeniu białych krwinek w odpowiedniej komorze, a następnie oznaczeniu odsetka limfocytów w barwionym rozmazie krwi, jest bardzo pracochłonna. Pewną oszczędność czasu można uzyskać rozcieńczając krew nie w mieszalnikach lecz w małych probówkach, jednakże i w tych warunkach badanie jest uciążliwe. Wielkim postępowaniem było zastosowanie urządzeń elektronicznych, np. licznika „Celloscope”, produkowanego przez firmę AB Lars Ljungberg, Sztokholm (cena: 6.600 koron szwedzkich), pozwalającego na bardzo szybkie i dokładne oznaczenie ogólnej ilości białych krwinek w jednostce objętości krwi. Urządzenia te jednakże nie usuwają konieczności sporządzania i barwienia rozmazów krwi oraz obliczania pod mikroskopem odsetka limfocytów.

W hematologicznym rozpoznawaniu białaczek u bydła czynione są próby wprowadzenia prostych metod, które już w założeniu obarczone są pewnym błędem. Można by tu zaliczyć metodę hematokrytowa, w której grubość warstwy leukocytów uformowana nad słupem czerwonych krwinek jest wskaźnikiem liczebności tych komórek w jednostce objętości krwi.

Schalm i Murray (4) opracowali metodę, w której specjalny odczynnik reaguje z kwasami nukleinowymi krwinek, występującymi u bydła — jak wiadomo — tylko w leukocytach. W wyniku reakcji lepkość krwi wzrasta proporcjonalnie do zawartości tych kwasów, co z kolei jest wskaźnikiem liczebności białych krwinek. Metoda ta wykazując leukocytozę nie informuje, który z szeregów białokrwinkowych zwiększył swą liczebność: granulocytarny, limfocytarny czy też monocytarny.

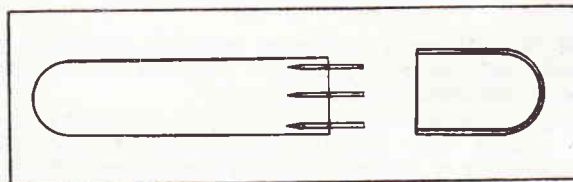
Za punkt wyjścia niżej przedstawionej metody własnej obrano technikę grubej kropli (5). W metodzie tej dużą kroplę krwi daje się na szkiełko podstawkowe, a po wyschnięciu przeprowadza się hemolizę erytrocytów wodnym roztworem barwnika Giemsy, przy czym ulegają wybarwieniu białe krwinki. Preparat taki oglądany pod mikroskopem daje ogólną informację o ilości białych krwinek, przy czym można rozróżnić poszczególne rodzaje tych komórek.

Sanders i współpracownicy (3) opisali opartą na tej zasadzie metodę polegającą na sporządzaniu plamek krwi na szkiełkach podstawkowych przy pomocy główki szpilki. Preparaty te były hemolizowane i wybarwiane barwnikiem Giemsy względnie błękitem metylenowym. Ogólną ilość białych krwinek oceniano w tych preparatach porównując je wzrokowo ze standardowymi preparatami o znanej ilości leukocytów.

### Opis metody

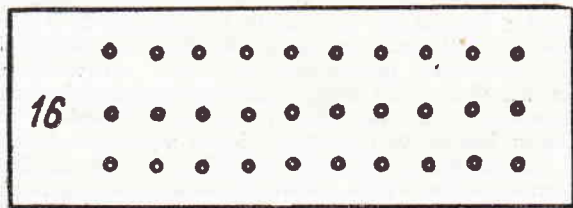
#### a. Sporządzanie preparatów.

Do sporządzania preparatów krwi służy przyrząd przedstawiony na ryc. 1. Składa się on z trzech kawałków drutu o średnicy 0,8 mm osadzonych w trzonku z pleksiglasu. Końce drutów powinny być wyrównane pod kątem prostym, przy czym płaszczyzna szlifowa powinna być wspólna dla wszystkich trzech drutów.



Ryc. 1. Przyrząd do sporządzania preparatów krwi

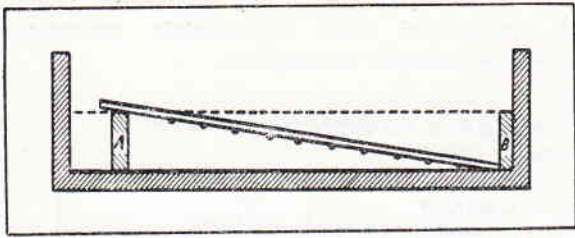
Końce drutów należy zanurzyć w krwi na głębokość około 1 mm i następnie przyłożyć je do starannie odtłuszczonego szkiełka podstawowego. Zarówno przyłożenie, jak i odjęcie przyrządu od szkiełka powinno być prostopadłe. W ten sposób otrzymuje się na szkiełku trzy koliste plamki krwi o średnicy około 1 mm. Następnie przyrząd zanurza się w krwi powtórnie i w analogiczny sposób sporządza się drugi zapasowy preparat. Przed przejściem do następnej próbki krwi należy końce drutów zanurzyć w wodzie i wytrzeć miękkim płótnem. Na jednym szkiełku podstawowym można w ten sposób sporządzić preparaty krwi kilku zwierząt (ryc. 2). Preparaty powinny wysychać w pozycji poziomej. Należy je w tym czasie zabezpieczyć przed muchami i kurzem. Do przechowywania i przewożenia preparatów powinno się używać pudełek specjalnie do tego celu przystosowanych.



Ryc. 2. Preparaty krwi 10 zwierząt na jednym szkiełku podstawowym

#### b. Hemolizowanie, utrwalanie i barwienie preparatów.

Wyschnięte preparaty należy ułożyć w płytkim naczyniu na mostkach szklanych w ten sposób, by powierzchnie szkiełek z plamkami krwi były skierowane ku dołowi. Szkiełka powinny być ułożone poziomo lub lekko ukośnie (ryc. 3). Następnie do naczynia należy wlać formaliny rozcieńczonej wodą destylowaną w stosunku 1:20 (2% roztwór formaldehydu). Po chwili obserwuje się spływające z preparatów ku dołowi smugi hemoglobiny, przy czym zaznacza się blednięcie plamek krwi. W parę minut po zupełnym odbarwieniu preparatów należy wyjąć je z formaliny, opłukać delikatnie w naczyniu z wo-



Ryc. 3. Hemoliza i utwalenie preparatów w roztworze formaliny. Preparaty znajdują się na dolnej powierzchni szkiełka.

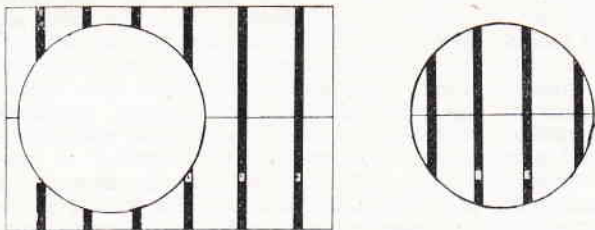
dą destylowaną i wysuszyć na stojaku. Preparaty w ten sposób zhemolizowane i utwalone można bezwzględnie barwić względnie przechowywać przez kilkanaście dni.

Preparaty barwi się sudanem czarnym wg Lisona. Roztwór barwnika należy przygotować w następujący sposób: 0,3 g czarnego sudanu B rozpuścić w 100 ml absolutnego alkoholu. W termostacie o temperaturze 37° rozpuszczanie trwa około 24 godz. Nadto należy przygotować bufor. W tym celu rozpuszcza się 16 g czystego, krystalicznego fenolu w 30 ml alkoholu absolutnego, a następnie 0,3 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O w 100 ml wody destylowanej i obydwie roztwory miesza się. 40 ml tak przygotowanego buforu w połączeniu z 60 ml alkoholowego roztworu sudanu stanowi właściwy barwnik, który przed użyciem należy przesączyć.

Utrwalone preparaty wkłada się do napełnionego barwnikiem szklanego naczynka z przykrywką. Po 30 minutach barwienia w temperaturze pokojowej splukuje się preparaty w 70% alkoholu etylowym tak, by zmyć z nich nadmiar barwnika, ale nie odbarwić krwinek. Następnie preparaty podbarwia się przez pół minuty roztworem błękitu metylenowego wg Löfflera. Podbarwione preparaty splukuje się wodą destylowaną, suszy i przechowuje w pudełkach. W tak wybarwionych preparatach łatwo jest odróżnić granulocyty z sudanofilną ziarnistością od pozostałych krwinek wybarwionych tylko błękitem metylenowym.

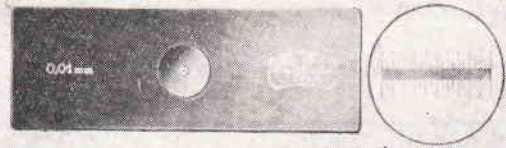
c. Przygotowanie mikroskopu i obliczenie ilości limfocytów.

Do okularu mikroskopowego należy włożyć wkładkę wyznaczającą na preparacie oglądanym pod imersją pas o szerokości 47 μ. Wkładkę tę najlepiej jest sporządzić z błony fotograficznej, na której jest obraz czarnych linii oddzielających jasne pola o szerokości 5—4,75—4,5—4,25—4 mm (ryc. 4). Krążek o średnicy około 2 cm powinien być wycięty z takiego miejsca filmu, by w środku jego było pole odpowiadające na oglądanym przez obiektyw imersyjny preparacie pasowi 47 μ. Zmierzyć to można przy pomocy mikrometru przedmiotowego (Objektmikrometr 1:100) produkcji VEB Carl Zeiss, Jena, NRD (ryc. 5).



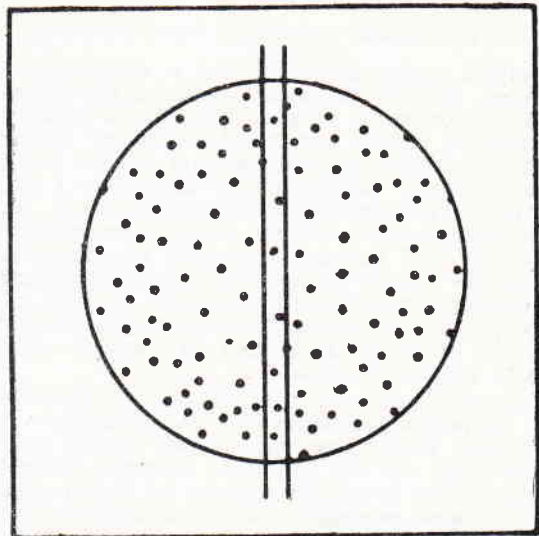
Ryc. 4. Odcinek filmu z układem jasnych pasów o stopniowo wzrastającej szerokości. Z prawej strony: wkładka do okularu mikroskopowego wycięta z tego filmu.

Przystępując do obliczenia ilości limfocytów należy pod małym powiększeniem mikroskopowym wyszukać odpowiedni preparat i sprawdzić, czy nie jest



Ryc. 5. Mikrometr przedmiotowy (Objektmikrometer) produkcji C. Zeiss, Jena.

uszkodzony. Po pokryciu preparatu olejkim cedrowym należy wprowadzić w oś optyczną mikroskopu obiektyw imersyjny, powiększający 90—100 razy. W polu widzenia należy umieścić środek górnego brzegu preparatu, a następnie przesuwając preparat w górę przy pomocy stołika krzyżowego należy liczyć limfocyty w wyznaczonym przez wkładkę okularową pasie o szerokości 47 mikronów. Limfocyty leżące na linii granicznej liczy się wówczas, gdy większa część komórki znajduje się w obrębie pasa (ryc. 6).



Ryc. 6. Schematyczne przedstawienie zabarwionego preparatu krwi z zaznaczeniem 47-mikronowego pasa, w którym przeprowadza się liczenie limfocytów.

Jeśli wartości limfocytów obliczone w dwu plamkach krwi tego samego zwierzęcia różnią się nieznacznie, należy obliczyć średnią arytmetyczną. Liczba ta pomnożona przez 300 przedstawia ilość limfocytów w 1 mm<sup>3</sup> krwi. W razie wystąpienia większych różnic między wynikami dwu obliczeń trzeba dodatkowo wyznaczyć analogiczną wartość w plamce trzeciej. Suma uzyskanych trzech wartości pomnożona przez 100 wykazuje liczbę limfocytów w 1 mm<sup>3</sup> krwi.

Porównując liczby limfocytów w 1 mm<sup>3</sup> krwi uzyskane przy użyciu uproszczonej metody z analogicznymi wartościami opartymi na metodzie klasycznej (komora Bürkera i barwiony rozmaz) stwierdza się korelację, której współczynnik obliczony na podstawie wzoru:

$$r_{xy} = \frac{nS_{xy}}{\sqrt{nS_x^2 nS_y^2}}$$

wahał się w granicach od 0,8 do 0,9.

d. Rozpoznanie hematologiczne białaczki.

W ocenie wyników badania hematologicznego przyjęto jako miernik klucz getyndzki opracowany przez Tollego (6). Z klucza tego można korzystać w oryginalnej postaci (tab. 1, kolumna A), zwłaszcza gdy do-

konuje się obliczeń w trzech plamkach krwi. Natomiast jeżeli oblicza się średnią wartość limfocytów dla jednej plamki wówczas wygodniej jest korzystać z tabeli odpowiednio zmienionej (tab. 1, kolumna B).

Do rutynowego wykonywania preparatów powinni być dopuszczeni tylko odpowiednio przeszkoleni i przeegzaminowani pracownicy.

Tab. 1. Klucz getyndzki do oceny wyników badania hematologicznego w rozpoznawaniu białaczki u bydła.

Wiek zwierząt w latach	Liczba limfocytów					
	A. w 1 mm <sup>3</sup> krwi			B. obliczonych metoda uproszczoną w jednej plamce (1/300mm <sup>3</sup> )		
	zdrowych	u zwierząt podejrzanych	białaczkowych	zdrowych	u zwierząt podejrzanych	białaczkowych
0-1	do 10000	10000 - 13000	ponad 13000	do 33	33 - 43	ponad 43
1-2	do 9000	9000 - 12000	„ 12000	do 30	30 - 40	„ 40
2-3	do 7500	7500 - 10000	„ 10000	do 25	25 - 33	„ 33
3-6	do 6500	6500 - 9000	„ 9000	do 22	22 - 30	„ 30
ponad 6	do 5500	5500 - 7500	„ 7500	do 18	18 - 25	„ 25

#### Organizacja badań terenowych

Badania można przeprowadzać w oborze pod warunkiem, że jest ona jasna i ciepła, a powietrze nie zawiera zbyt wiele wilgoci. Warunki te częściej są spełnione w okresie letnim. Sporządzający preparaty powinien siedzieć przy stoliku, na którym jest pudełko z dobrze odtłuszczonymi alkoholem i eterem szkiełkami podstawowymi ponumerowanymi ołówkiem diamentowym, kawałki papieru pergaminowego o boku około 7 cm, dwa przyrządy do sporządzania preparatów (jeden zapasowy na wypadek uszkodzenia drugiego), mała miseczka z wodą, kawałek miękkiego płótna oraz papier do zapisywania kolejnych numerów zwierząt. Obok stołu na posadzce powinno stać wiadro na odpadki.

Donoszący próbówki z krwią odlewa około 2 ml krwi na papier pergaminowy i podaje ustnie numer zwierzęcia. Resztę krwi z próbek można użyć do innego celu, np. do badań w kierunku brucelozy. Sporządzający preparaty zapisuje na kartce podany numer, nanosi przyrządem krew na szkiełka, wyrzuca do wiadra papier z resztą krwi i czyści przyrząd. Jeśli to możliwe, zapisywanie numerów krów przeprowadza osobny pracownik. Stół ze wszystkimi materiałami przenosi się od czasu do czasu na inne miejsce, by zmniejszyć odległość donoszenia krwi. Utrwalenia i barwienia preparatów dokonuje się po ich przewiezieniu do pomieszczeń laboratoryjnych.

Jeśli w oborze jest ciemno, względnie zimno i wilgoć utrudniają wysychanie preparatów, lepiej jest posługiwać się krwią z dodatkiem szczawianu. W tym celu do próbek o pojemności 6—7 ml daje się po 10 mg mialko roztartego w moździerzu szczawianu sodu, potasu lub amonu, po czym próbówki zamyka się gumowymi korkami. Do próbek tych pobiera się po 5 ml krwi zaznaczając na każdej próbce numer zwierzęcia. Po przewiezieniu krwi do pracowni lub innego odpowiedniego pomieszczenia należy sporządzić możliwie w tym samym dniu preparaty. Hemolizę i utrwalenie preparatów w formalinie dobrze jest przeprowadzić jeszcze w tym samym dniu lub najajutrz. Barwienie można przeprowadzać bezzwłocznie lub po upływie kilku — kilkunastu dni.

Przed rozpoczęciem masowych badań zaleca się skonfrontować opisaną metodę z metodą klasyczną opartą na obliczeniach w komórce Bürkera i odsetkowym składzie białych krwinek w barwionym rozmazie. Porównanie takie jest najlepszym sprawdzianem prawidłowości użytego sprzętu oraz sposobu sporządzenia preparatów.

#### Omówienie

Przedstawiona metoda przeszła w procesie opracowywania szereg zmian i zapewne będą następowały dalsze jej udoskonalenia. Wiele prac doświadczalnych poświęcono zagadnieniu, jak powinien przedstawiać się preparat krwi oraz przyrząd do jego sporządzenia. Płasko zeszlifowane zakończenia drutów okazały się doskonalsze od zaokrąglonych, uzyskiwano bowiem przy ich użyciu bardziej wyrównaną wielkość preparatów.

Przyrząd zespalający trzy druty zaoszczędza wielu ruchów, które musiałoby się wykonać sporządzając preparaty jednym drutem. Nadto przyrząd ułatwia prostopadle przystawienie drutów do szkiełka i ich odjęcie. Ustawienie drutów w jednej linii ułatwia ich oczyszczenie po użyciu. Próby zastosowania szablonu, który by ułatwiał prostopadle przykładanie przyrządu do szkiełka oraz równomierne rozmieszczenie preparatów, nie dały dotychczas pożądaných wyników.

Szkiełka na preparaty muszą być numerowane, do czego najlepiej nadaje się ołówek diamentowy. Przy braku takiego ołówka posługiwano się w badaniach własnych odpowiednio zeszlifowanym kawałkiem widii (rodzaj spieku węglkowego). Można też zastosować tu sposób zalecony przez Schillinga przy grubej kropli. Mianowicie, rozmazuje się nieco krwi wzdłuż krótszej krawędzi szkiełka i po wyschnięciu zaznacza się na tym rozmazie numer przy pomocy zwykłego ołówka. Przed hemolizowaniem preparatu znaczek ten należy utrwalic alkoholem metylowym zwracając uwagę, by alkohol nie utrwalił właściwego preparatu.

Podczas pierwszych prób przeprowadzano hemolizowanie preparatów wodnym roztworem barwnika Giemsa względnie wodą destylowaną. Powodowało to jednak uszkodzenie licznych plamek krwi, zwłaszcza podczas wyjmowania szkiełek z barwnika względnie wody. Częściowo można było tym uszkodzeniom zapobiec odtłuszczając bardzo starannie szkiełka w alkoholu i eterze, a następnie opalając je nad płomieniem. Przeprowadzanie hemolizy w roztworze formaliny 1:20 trwa co prawda dłużej, ale preparaty pozostają nieuszkodzone. Na uwagę zasługuje jeden z badanych wariantów, w którym hemoliza rozpoczyna się w wodzie destylowanej, do której po paru minutach wkrapla się stężoną formalinę w takiej ilości, by końcowe jej stężenie wynosiło 1:15 (1). Ten sposób przeprowadzania hemolizy jest jednak bardziej pracochłonny od sposobu podanego w opisie metody. Z tego względu nie można go zalecać do masowych badań. Mógłby on ewentualnie znaleźć

zastosowanie w hemolizowaniu starych preparatów, w których z reguły proces ten zachodzi bardzo powoli.

Hemolizę początkowo próbowano przeprowadzić tak jak przy grubej kropli tzn. szkiełko było ułożone na mostku preparatami ku górze. Później zmieniono ułożenie szkiełek na pionowe, w naczynku do barwienia, i wreszcie na poziome, ale preparatami ku dołowi. Przy takim ułożeniu hemoglobina z preparatu szybko odpływa, na skutek czego tło dookoła białych krwinek jest czystsze.

Wypróbowano również różne metody barwienia krwinek. Przy użyciu samego barwnika Giemsy trudno było odróżnić granulocyty neutrofilne od limfocytów. Dlatego też zastosowano barwienie wybiórcze. Zadowalające wyniki dawało barwienie na peroksydazy metodą Grahama i Knolla względnie metodą Sato, jednakże w starych preparatach odczyn ten był bardzo słaby. Próbowano również metody PAS, jednakże jest ona pracochłonna, a nadto przy jej użyciu dodatnio barwią się nie tylko granulocyty lecz również część limfocytów. Najlepszy do wybiórczego barwienia granulocytów okazał się sudan czarny B.

Do podbarwienia preparatów, celem umiędocznienia pozostałych krwinek używano 1% wodnego roztworu zieleni metylowej, lub analogicznego roztworu safraniny. Najlepsze jednak wyniki dawał roztwór błękitu metylenowego wg Löfflera, ponieważ barwił szybko uwidaczniając przy tym nie tylko jądra komórkowe lecz również cytoplazmę.

Wkładka do okularu, wyznaczająca pas o odpowiedniej szerokości przeszła również swoją ewolucję. Początkowo posługiwano się wkładką sporządzoną z cienkich włókien nylonowych względnie włosów rozpiętych w kartonowym pierścieniu. Sporządzenie takich wkładek kosztowało jednak wiele trudu. Dlatego też opracowano inną metodę. Na kartonie narysowano układ pasów o stopniowo malejącej szerokości. Rysunek ten fotografowano i uzyskiwano różnicę na błonie fotograficznej odbitki pozytywowe o odpowiedniej wielkości. W niektórych przypadkach skala okazała się niewystarczająca, ponieważ nawet największy pasek wykazywał więcej niż 47  $\mu$ . Wówczas przygotowywano odbitki w odpowiednim pomniejszeniu.

Kontrolowanie wkładki okularowej za pomocą mikrometru przedmiotowego może sprawiać trudności, jeśli używa się obiektywu immersyjnego, ponieważ trudno jest tu ustawić mikronową skalę równocześnie w polu widzenia oraz w płaszczyźnie ogniska soczewek obiektywu. Można jednakże dobrać odpowiednią wkładkę używając obiektywu o słabszym powiększeniu. Np. gdy chcemy używać w badaniach obiektywu 90 $\times$ , a przy dobieganiu prawidłowej wkładki posługiwaliśmy się obiektywem 40 $\times$ , to szerokość środkowego pasa wkładki powinna przy pomiarze wynosić  $\frac{47 \times 90}{40}$  mikronów, to jest 10,6 podziałek

40

skali mikrometru.

Do oceny diagnostycznej uzyskanych wyników został zastosowany klucz getyndzki. Wstępne badania wykazały, że klucz ten został opracowany na podstawie wartości odpowiadających na ogół normom hematologicznym bydła w Polsce. Prowadzone obecnie badania niewątpliwie wskażą, czy nie zachodzi konieczność wprowadzenia pewnych poprawek do klucza, względnie zróżnicowania go w zależności od ras bydła lub warunków środowiskowych, tak różnorodnych w poszczególnych rejonach kraju.

Opisana metoda została opracowana pod kątem badań hematologicznych u bydła. Z nielicznych, przeprowadzonych dotychczas prób wynika, że metoda ta może być użyta do oznaczania ilości białych krwinek u innych gatunków zwierząt. Warunki barwienia preparatów muszą być jednakże dostosowane osobno dla każdego gatunku.

## Piśmiennictwo

1. Grundboeck M.: Badania nad białaczką u bydła. II. Nowa metoda obliczania limfocytów w 1 mm<sup>3</sup> krwi, Biuletyn III Zjazdu PTNW, str. 317, Lublin 1966.
2. Morgan H. C.: The hematocrit in veterinary medicine, Vet. Med. 61, 317 (1966).
3. Sanders C., Cox R., Sharples J. B.: Method for rapid determination of the total leucocyte count, J. Med. Lab. Techn. 17, 21 (1960).
4. Schalm O. W., Murray R.: Estimation of blood leukocyte numbers by means of a DNA viscosity test, J. Am. Vet. Med. Assoc. 145, 1177 (1964).
5. Schilling V.: Praktische Blutlehre, VEB Gustav Fischer Verlag, Jena (1959).
6. Tolle A.: Zur Beurteilung quantitativer hämatologischer Befunde im Rahmen der Leukose-Diagnostik beim Rind, Zbl. f. Veterinärmed. B, 12, 281 (1965).

Грундбэк М. — Быстрый метод гематологического диагноза лейкоза у крупного рогатого скота.

Описан простой метод констатирования лимфоцитоза. Препараты из крови приготавливали при помощи простого аппарата состоящего из трех металлических спиц диаметром 0,8 мм, вставленных в рукоятку из плексигласа (рис. 1). Концы спиц погружают в свежую или оксалтную кровь на глубину 1 мм, в затем приставляют перпендикулярно к предметному стеклу, приготавливая таким образом три малые капли крови. Они имеют круглую форму и диаметр ок. 1 мм. На одном предметном стекле можно приготовить препараты крови из 7—10 животных.

После высушения препаратов стекло погружают в формалин (1:20), до полного удаления гемоглобина, ополаскивают водой и препараты окрашивают черным суданом В по методу Лизона. Добавочную окраску проводят метиловой синькой Лёффлера. Подсчет лимфоцитов производят под иммерсией (в поле зрения шириной 47 микронов). Полученный результат перемноженный через 300 дает количество лимфоцитов в 1 мм<sup>3</sup> крови. Поле зрения, употребляемое для подсчета устанавливается при помощи соответственной сетки, помещенной в окуляре микроскопа.

Диагноз лейкоза проводят на основании „лейкозного ключа“ по Толле.

Grundboeck M. — A rapid method for haematological diagnosis of leukosis in cattle.

The method is based on the demonstration of lymphocytosis by means of a simplified technique. The blood preparations are made with the use of a simple instrument consisting of three pieces of wire 0.8 mm in diameter, mounted on a shaft made of perspex (Fig. 1). The preparations are made of fresh or oxalated blood. The ends of the wires are dipped then placed at a right angle into contact with the into the sample of blood to a depth of 1 mm, and microscopic slide. By this means, three small drops are deposited on the glass. They are round in shape and their diameter is about 1 mm. The blood preparations of 7—10 animals can be made on one slide (Fig. 2).

When dry, the slides are placed into 1:20 formalin solution in distilled water, until all haemoglobin is removed (Fig. 3) and washed carefully with water. The preparations are then stained with sudan black B, according to Lison, and counterstained with Löffler's methylene blue.

Using the immersion objective, lymphocytes are counted along the diameter of the blood spots in the zone 47  $\mu$  wide (Fig. 6). The obtained figures when multiplied by 300 gives the number of lymphocytes in 1 cmm of blood. The area for counting lymphocytes is marked out by an ocular reticle placed into the eyepiece of the microscope (Fig. 4).

The haematological diagnosis of leukosis is based on the Göttinger key, worked out by Tolle (6).