

Пастуха А. — Приготовление гистологических парафиновых срезов при помощи стеклянного ножа и модифицированной техники.

Ножи готовили из стеклянных плит толщиной 5—7 мм. Плиты резали на стеклянные полоски (с.п.) шириной 20—30 мм. На одном стороне каждой с.п. делали алмазным или стеклянным резцом перпендикулярную царапину в виде круга. Полученные с.п. укладывали на столе царапиной в верх и под них подкладывали в расстоянии ок. 5 мм перед царапиной (рис. 1) деревянную спичку. Потом с.п. покрывали деревянной или пластмассовой линейкой и держа левой рукой в точке  $F_1$  придавливали правой рукой в точке  $F_2$ , в следствие чего стекло трескалось вдоль кривой показанной на нижней части рис. 1 и получался режущий клин. Стеклянные ножи могут быть легко монтированы в микротоме. Парафиновые срезы собираются на металлическом желобе прикрепленном прямо к ножу при помощи смеси воска (Sira Wax-British Drug Houses Ltd) и парафина. Желоб надо наполнять водой до режущего клина (рис. 2). Получаемые срезы должны свободно плавать. Отдельно или серийно приготовленные срезы поднимают из воды при помощи специально приготовленного куска стекла или плексигласа, вкладываемого на дно желоба. Дальнейшая обработка — такая же как при срезах приготовленных конвенциональным стальным ножом. Автор употребляет описанную технику в своей лаборатории и хорошими результатами уже 3 года.

Pastucha A. — Improvement of preparation of histological paraffin sections by means of glass knife and modified technique.

The knives have been made of glass plates 5—7 mm thick. The plates are cut in strips 20—30 mm wide. Then, on one surface of them perpendicular scores are scratched with a glazier's diamond or glass scorer of the wheel type. The strips are put on a table with the score marks upside. Then a wooden match is placed under the strip, about 5 mm before one of the score marks (Fig. 1). Next, the glass strip should be covered with a plastic or wooden ruler. One holds the strip with the left hand at the point  $F_1$  and then presses firmly with the right hand at the point  $F_2$ . The glass breaks along the curve shown on the lower part of Fig. 1, giving a cutting edge.

The glass knife can be mounted in the microtome by means of a simple fastener (Fig. 2). The sections are collected in the metal trough, fastened directly on the knife by means of a mixture of Sira Wax (British Drug Houses Ltd.) with solid paraffin. The trough should be filled with water which must reach to the cutting edge of the knife (Fig. 3). Immediately after sectioning, the sections should float free. The single or serial sections are lifted by the use of a special formed glass or perspex strip, placed on the bottom of the trough. Further procedure is the same as with the sections cut with a steel knife.

The above described technique has many advantages. It has been applied in our Laboratory for three years yielding constantly good results.

DANUTA ROMANOWSKA

## Porównanie przydatności próbki z wyłobieniem ze standardową próbką serologiczną w uproszczonej metodzie aglutynacji\*)

Zakład Higieny Weterynaryjnej w Warszawie  
Kierownik: dr habil. S. SAMOL

Obowiązująca od 15.XI.64 r. instrukcja tymczasowa Nr 15 Ministerstwa Rolnictwa Dep. Weterynarii z 27.X.64 r. w sprawie zasad wykonywania badań na brucellozę za pomocą aglutynacji próbkowej, zaleca w metodzie uproszczonej (rozlewanie materiału diagnostycznego mikropipetą) stosowanie specjalnych próbek aglutynacyjnych. Probówki te wystandardyzowane przez (Anczykowskiego i Murat — 2) posiadają specjalne wyłobienie mające zapewnić dokładniejsze spłukanie surowicy zawieszoną antygenu ze ścian próbki, dzięki czemu błąd techniczny metody ma ulec zmniejszeniu.

Stosowanie próbek z wyłobieniem w rutynowej pracy usługowej nastęrcza jednak szereg trudności:

1) Przedłuża czas nastawiania próby. W toku wykonywania próby istnieje konieczność dwukrotnego ustawiania próbek w statywach pod odpowiednim kątem (przy rozlewaniu materiału diagnostycznego i zawiesziny antygenu). W wypadkach stosowania do rozlewania zawiesziny antygenu dyspensera (Unipan

313), co ma miejsce w tut. Zakładzie — laborant nie jest w stanie nadażyć z właściwym ukierunkowaniem wyłobienia próbek wobec znacznej szybkości rozlań na minutę (od 20 do 150, przeciętnie ok. 80/min.).

2) Względny ekonomiczny. Koszt próbki z wyłobieniem jest o około 25% wyższy niż próbki standardowej.

3) Znacznie szybsza używalność próbek z wyłobieniem — łatwość kruszenia się próbki w okolicy wyłobienia, zarówno w czasie pracy, jak i w trakcie mycia. W związku z powyższym postanowiono porównać wyniki otrzymane w metodzie uproszczonej przy zastosowaniu próbek z wyłobieniem i próbek typowych, oraz porównać dokładność wyników uzyskanych przy rozlewaniu zawiesziny antygenu pipetą i dyspenserem w odniesieniu do obu rodzajów próbek.

### Materiał i metody

Materiał diagnostyczny stanowiło 89 surowic o mianach od granicznie wątpliwych, poprzez wątpliwe, granicznie dodatnich i dodatnich (200 j.m.). A więc takie miana, które dają się uzyskać w zakresie rutynowo nastawianych czterech kolejnych końcowych rozcieńczeń surowicy, 1/12,5, 1/25, 1/50 i 1/100. W doświadczeniu posługiwano się surowicami niekonserwowanymi w miarę uzyskiwania materiału diagnostycznego.

\*) Powyższa praca podjęta i wykonana została dzięki inicjatywie i cennej pomocy doc. dra F. Anczykowskiego — Kierownika Pracowni Badania Brucellozy Instytutu Wet. w Puławach, za co autor składa tą drogą serdeczne podziękowania.

Z każdą surowicą diagnostyczną wykonano próbę aglutynacji probówkowej metodą uproszczoną posługując się probówkami z wyżłobieniem i bez wyżłobienia, oraz rozlewając zawiesinę antygeny pipetą i dyspenserem do obu rodzajów probówek.

Dokładność obu metod rozlewania zawiesiny antygeny i wyników aglutynacji otrzymanych przy użyciu probówek z wyżłobieniem i bez wyżłobienia sprawdzono testem istotności F dla różnicy dwóch wariancji, oraz testem t Studenta.

#### Technika nastawiania prób

Każdą próbę z wybraną surowicą diagnostyczną nastawiano w trzykrotnym powtórzeniu stosując oba rodzaje probówek i oba sposoby rozlewania zawiesiny antygeny.

Wszystkie surowice diagnostyczne użyte w doświadczeniu rozlewane były przy użyciu stale tej samej mikropipety, dokładność której sprawdzono metodą wagową. Zawiesinę antygeny rozlewano stale tą samą pipetą o pojemności 5 ml., lub dyspenserem (Unipan typ 313) o dokładności rozlań do 0,005 ml.

Jako antygeny używano w doświadczeniu zawiesiny stale tej samej serii Brucellognostu, produkcji Puławskich Zakładów Przemysłu Bioweterynaryjnego, rozcieńczonego w stosunku 1:20 5% roztworem NaCl z dodatkiem 0,5% fenolu.

Celem uniknięcia możliwości wystąpienia niespecyficznych reakcji, probówki przed użyciem do doświadczenia gotowane były w roztworze mydła i dokładnie trzykrotnie płukane w wodzie destylowanej, a następnie suszone w temp. ok. 180°C.

Nastawiane w doświadczeniu próby wstawiano do termostatu o temp. 37°C ok. godz. 14.00 jednego dnia i odczytywano zaraz po wyjęciu z termostatu następnego dnia ok. godz. 10.00.

Celem zachowania w doświadczeniu warunków zbliżonych do systemu pracy rutynowej, surowice diagnostyczne rozlewano w całym statywie, dawkując materiał diagnostyczny z mikropipety na ściany probówek i natychmiast splukiwano surowice zawiesiną antygeny zwracając uwagę na dokładne zmycie surowicy ze ścian probówek.

Przy rozlewaniu dyspenserem zawiesiny antygeny do probówek z wyżłobieniem zaistniała konieczność zwolnienia szybkości rozlań dyspensera do ok. 40 rozlań na minutę. Szybsze tempo rozlań uniemożliwiało odpowiednio dokładne ukierunkowywanie wyżłobienia probówek.

Po rozlaniu każdej surowicy, mikropipetę co najmniej trzykrotnie przepłukiwano, osuszano na ligninie, pierwszą, nabraną porcją następną surowicy usuwano z pipety, następnie surowicę nabierano ponownie do podziałki „O”, usuwano nadmiar surowicy z końca mikropipety zwitkiem ligniny i odpowiednio dawki surowicy rozlewano do probówek.

Wyniki odczytywano przy pomocy sporządzonych wzorców, używając do ich przygotowania tej samej serii Brucellognostu, którą posługiwano się w trakcie całego doświadczenia.

Uzyskane wyniki aglutynacji oceniano wg obowiązującej skali czteroplusowej, rozszerzonej o stopnie pośrednie. Np. aglutynację ocenianą pomiędzy ++ (płyn w probówce odbarwiony w 50%) a +++ (odbarwienie płynu w 75%) oznaczano ++(+++) — jeśli uzyskany wynik zbliżony był bardziej do ++, lub ++(+++) — jeśli obraz był bliższy ++++. Przy ocenie brano pod uwagę zarówno odbarwienie płynu w probówce, jak i wygląd osadu.

Zapisane przy pomocy w/w skali wyniki aglutynacji przeliczono na liczby zgodnie z podanym poniżej kluczem.

++++	4,00	++	2,00	±	0,25
++++(++++)	3,75	++(+)	1,75	±(+)	0,125
+++(++++)	3,50	++(+)	1,50	±(+)	0,0625
+++	3,00	+	1,00	±	0,03125
+++(+++)	2,75	±(+)	0,75	—	0,00
++(+++)	2,50	±(+)	0,50		

## Wyniki

Przebadano łącznie 89 surowic. W zależności od posiadanego miana, surowice podzielone zostały na IV grupy.

A.  $4,5 < m < 5,5$

B.  $5,5 < m < 6,5$

C.  $6,5 < m < 7,5$

D.  $7,5 < m$

gdzie m = miano

Do grupy A zaszeregowano 11 surowic, do B — 11, do C — 31 i do D — 36 surowic o zbliżonych mianach.

Uzyskane wyniki aglutynacji nastawianej zarówno w probówkach z wyżłobieniem, jak i bez wyżłobienia, przy rozlewaniu zawiesiny antygeny pipetą, jak i dyspenserem, wykazały daleko idącą zbieżność. Występujące minimalne różnice stopnia aglutynacji między obu grupami surowic nastawianych w różnych rodzajach probówek, między grupami zalewanymi w różny sposób zawiesiną antygeny i kolejnymi powtórzeniami poszczególnych surowic, zawsze, oprócz jednej surowicy nie przekraczały wartości jednego plusa, co w żadnym przypadku nie rzutowało na zmianę oceny miana poszczególnych surowic.

W całym szeregu surowic, w grupie, w której zawiesinę antygeny rozlewano dyspenserem, uzyskano miana wyższe o pół plusa od mian uzyskanych przy nastawianiu tychże samych surowic w grupie, gdzie zawiesina antygeny rozlewana była pipetą, co jednak również nie rzutowało na zmianę oceny miana danych surowic.

Różnica, która wystąpiła w przypadku jednej z surowic, dotyczyła surowicy rozlewanej do probówek z wcięciem, gdzie zawiesina antygeny rozlewana była pipetą.

Zapis wyników (w trzech powtórzeniach) był następujący:

- a. ++++(++++) +++ + —  
 b. ++++(++++) +++ — +  
 c. ++++(++++) +++(++++) + —

Zaistniała różnica przemawiać może za niewłaściwym technicznie wykonaniem probówki z wcięciem (zbyt wąskie wcięcie uniemożliwiające mikropipetę dotknięcie przeciwległej ściany probówki) i mechanicznym przeniesieniem dawki 0,02 ml. surowicy z probówki trzeciej do czwartej na końcu pipety, bądź też za błędem technicznym nastawienia próby.

Otrzymane w doświadczeniu wyniki aglutynacji przeliczono statystycznie przy pomocy testu Studenta. W teście t Studenta nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy poszczególnymi grupami doświadczalnymi w obrębie surowic o podobnych mianach (t 0,05 było zawsze większe od t°), — patrz zestawienie wyników.

Dokładność metod opartych na rozlewaniu zawiesiny antygeny pipetą i dyspenserem przy użyciu probówek z wyżłobieniem i bez wyżłobienia

bienia sprawdzono testem istotności  $F$  dla różnicy dwóch wariancji.

Na 16 przeprowadzonych porównań, w 15 przypadkach  $F^{\circ}$  było mniejsze od  $F_{0,05}$  a więc przy 5% poziomie istotności nie stwierdzono istotnej różnicy w dokładności wykonywania badań.

Jedynie w przypadku rozlewania antygeny pipetą do surowic o bardzo wysokich mianach (grupa D) stwierdzono istotność różnic między wariancjami, przy czym, przy użyciu probówek z wyłobieniem rozrzut wyników był większy niż przy użyciu probówek bez wyłobienia, a więc metoda pierwsza w tym jednym wypadku okazała się nieco mniej dokładna.

$F^{\circ}_{AI,II} = 1,14 < F_{0,05} = 3,18$	$F^{\circ}_{AIII,IV} = 1,44 < F_{0,05} = 3,18$
$F^{\circ}_{BI,II} = 2,00 < F_{0,05} = 3,18$	$F^{\circ}_{BIII,IV} = 1,29 < F_{0,05} = 3,18$
$F^{\circ}_{CI,II} = 1,00 < F_{0,05} = 1,85$	$F^{\circ}_{CIII,IV} = 1,33 < F_{0,05} = 1,85$
$F^{\circ}_{DI,II} = 1,59 < F_{0,05} = 1,78$	$F^{\circ}_{DIII,IV} = 1,30 < F_{0,05} = 1,78$
$F^{\circ}_{AI,III} = 1,29 < F_{0,05} = 3,18$	$F^{\circ}_{AII,IV} = 1,63 < F_{0,05} = 3,18$
$F^{\circ}_{BI,III} = 2,33 < F_{0,05} = 3,18$	$F^{\circ}_{BII,IV} = 1,50 < F_{0,05} = 3,18$
$F^{\circ}_{CI,III} = 1,33 < F_{0,05} = 1,85$	$F^{\circ}_{CII,IV} = 1,00 < F_{0,05} = 1,85$
$F^{\circ}_{DI,III} = 1,88 > F_{0,05} = 1,78$	$F^{\circ}_{DII,IV} = 1,09 < F_{0,05} = 1,78$

Tab. 1. Zestawienie wyników

Antygen rozlewany		Probówki z wyłobieniem		Probówki bez wyłobienia	
		pipetą	dyspensserem	pipetą	dyspensserem
A	n	10	10	10	10
	$\bar{y}$	5,03	4,99	5,04	5,01
	$S^2$	0,07	0,08	0,09	0,13
	L	$\pm 0,18$	$\pm 0,20$	$\pm 0,22$	$\pm 0,24$
B	n	10	10	10	10
	$\bar{y}$	6,10	5,97	5,96	6,05
	$S^2$	0,03	0,06	0,07	0,09
	L	$\pm 0,13$	$\pm 0,16$	$\pm 0,18$	$\pm 0,22$
C	n	30	30	30	30
	$\bar{y}$	7,09	7,02	7,05	7,07
	$S^2$	0,06	0,06	0,08	0,06
	L	$\pm 0,09$	$\pm 0,09$	$\pm 0,11$	$\pm 0,09$
D	n	35	35	35	35
	$\bar{y}$	8,31	8,27	8,40	8,37
	$S^2$	0,51	0,32	0,27	0,35
	L	$\pm 0,25$	$\pm 0,18$	$\pm 0,17$	$\pm 0,20$

n — półprzedział

$\bar{y}$  — średnia arytmetyczna miana

$S^2$  — wariancja

L — półprzedział ufności

### Wnioski

Na podstawie uzyskanych wyników wydaje się, że w rutynowej pracy pracowni serologicznych ZHW, — przy dokładnej pracy personelu laboranckiego, nie odgrywa istotnej roli rodzaj stosowanych probówek, tzn. z wyłobieniem lub bez.

Nie wpływa też w istotny sposób na wysokość uzyskiwanych mian użycie do rozlewania zawiesiny antygeny pipety lub dyspensera.

Również dokładność wszystkich czterech wariantów metody aglutynacji okazała się w praktyce taka sama.

Biorąc jednak pod uwagę względy ekonomiczne (koszt jednostkowy obu rodzajów probówek, oraz szybszą używalność probówek z wyłobieniem), jak również czas nastawiania pojedynczej próby, wydaje się, że w rutynowej pracy w pracowniach serologicznych można by było stosować probówki bez wyłobienia, zwracając jednak baczną uwagę na dokładne i szybkie splukiwanie surowic ze ścian probówek zawieszoną antygeny, celem niedopuszczenia do zaschnięcia surowicy na ścianach probówek, co mogłoby doprowadzić do uzyskania wyników pozornie ujemnych.

### Piśmiennictwo

1. Ministerstwo Rolnictwa — Dep. Weterynarii: Przepisy o zwalczaniu brucelozy zwierząt, PWRiL, 1968.
2. Anczykowski F., Murat P.: Medycyna Wet. 22, 418, 1966.
3. Świątlikowski M.: Medycyna Wet. 21, 693, 1965.

Adres autora: Danuta Romanowska, Warszawa, ul. Mickiewicza 34/36 m. 8.

**ZIV G., RISENBERG-TIRER R.:** Aktywność *in vitro* różnych antybiotyków w stosunku do szczepów *Pseudomonas* wyizolowanych z wymienia krów. (The *in vitro* activity of several antibiotics against *Pseudomonas* of bovine udder origin). Zentbl. Vet. Med. R. B., 17, 963—969, 1970 (9).

Przebadano *in vitro* wrażliwość 205 szczepów *Pseudomonas aeruginosa* (wyizolowanych z ostrych i chronicznych przypadków zapalenia wymienia u krów) na karbenicylinę, neomycynę, dwuhydrostreptomycynę, kanamycynę, polimyxynę B, kolistynę, tetracyklinę i gentamycynę. Wrażliwość na antybiotyki oznaczono metodą rozcieńczeń i metodą krążkową. Wyizolowane szczepy *Pseudomonas* były wrażliwe na gentamycynę, polimyxynę B, karbenicylinę i kolistynę. Stwierdzono występowanie ścisłej korelacji pomiędzy wrażliwością badanych szczepów na gentamycynę, polimyxynę B i karbenicylinę oznaczoną metodą rozcieńczeń i metodą krążkową.

Z. G.

**PEETOOM F., RUITENBERG E. J., KROES R., BERKENS J. M.:** Wpływ estrogenów na reakcje immunologiczne. (Influence of estrogens on the immune response). Zentbl. Vet. Med. R. B., 17, 989—991, 1970 (9).

Badania nad wpływem estrogenów na rozwój odpornościowych przeprowadzono na 8-tygodniowych cielętach stosując iniekcje 80 mg dietylstilbestrolu (DES). Po tygodniu od iniekcji estrogeny połowie cieląt wstrzyknięto domięśniowo toksoid błonniczy zaadsorbowany na wodorotlenku glinu w ilości 5 Lf/ml. Drugą dawkę toksoidu podano drugiego tygodnia po pierwszej iniekcji. W czasie badań prowadzonych przez okres 16 tygodni nie stwierdzono różnic w poziomie globulin surowicy u cieląt u których stosowano estrogen i cieląt grupy kontrolnej. Nie zaobserwowano również wpływu estrogeny na wielkość miana przeciwciał antytoksycznych u badanych cieląt.

Z. G.