

7. Głębica A., Niemczuk R., Sobieszczńska B.: *Nowości Wet.* 3, 371, 1973.
 8. Grobow O. F.: *Biul. Apicole*, 72, 127, 1971.
 9. Kostecki R.: *Biul. Infor. I.W.* 22, 1972.
 10. Matuszawski J.: *Informacja ustna*.
 11. Niemczuk R.: *Wiad. parazyt.* 10, 51, 1964.
 12. Niemczuk R.: *Zycie wet.* 10, 51, 1964.
 13. Niemczuk R., Podskarbi H., Sobieszczńska B.: *Medycyna Wet.* 26, 174, 1970.
 14. Niemczuk R.: *Wiad. parazyt.* 20, 881, 1974.
 15. Niemczuk R., Sobieszczńska B.: *Zycie wet.* 48, 274, 1973.
 16. Niemczuk R.: *Pszczelarstwo* 12, 6, 1974.
 17. Poitiev W. I.: *Pczelowodstwo* 15, 44, 1957.
 18. Schultz-Langner E. Z.: *Bienenforsch.* 11, 22, 1964.
 19. Sokolow W. P.: *Pczelowodstwo* 21, 39, 1963.
 20. Wille H.: *Schweiz. Bienenztg.* 83, 238, 1959.
- Adres autora: doc. dr Rudolf Niemczuk, ul. Kożuchowska 5, 51-631 Wrocław.

Немчук Р., Собещаньска Б. — Простейшие в пасаках Нижней Силезии.

Авторы провели исследования по появлению у взрослых пчел (*Apis mellifica* L.) трех болезней пищеварительного тракта, а именно: нозематоза, амебиаза и заболевания вызванного жгутиковыми. Появление двух первых установили с 1962 г. а последней с 1970 г. Паразиты проживающие в клет-

ках эпителия пищеварительного кишечника, канальцев Мальпиги и тонких кишек вызывают тяжелые расстройства в метаболизме пчел, падение продуктивности пасеки а часто также замирание пчелиных роев. Против описанных болезней имеются уже эффективные терапевтические средства но надо их применять вместе с дезинфекцией зараженных пасек.

Niemczuk R., Sobieszczńska B. — **Protozoa in the Lower Silesia apiaries.**

The authors have analyzed the occurrence of three protozoan diseases of the digestive tract of adult bees (*Apis mellifica* L.): nosema disease, amoeba disease and leptomoniasis. Nosema and amoeba diseases were diagnosed since 1962 and leptomoniasis since 1970. The parasites infecting the epithelium of the ventriculus, Malpighian tubes and the small intestine cause serious disturbances in the metabolism of infected insects, decrease their productivity and destruct of a family. The diseases are now effectively treated, but the drugs should be applied simultaneously with disinfection of infected apiaries.

PRAKTYKA LABORATORYJNA

JANUSZ WIERCINSKI, ANDRZEJ SZEWCZUK

Przygotowywanie prób a precyzja i dokładność w metodzie ASA.

I. Oznaczanie Cu, Zn i Fe w surowicy krwi

Z Centralnego Laboratorium Aparaturowego AR w Lublinie

Atomowa spektrofotometria absorpcyjna (ASA) została wprowadzona do analizy materiału klinicznego w 1960 r. (20, 21, 22, 23). Doniesienia o podobnym zastosowaniu tej metody w Polsce mają miejsce w 10 lat później (4, 9).

Atomową spektrofotometrię absorpcyjną wykorzystano w pierwszym rzędzie do analizy składników mineralnych surowicy krwi. Zalety tej metody — wysoka czułość i swoistość, prostota postępowania — zdecydowały, że wyparła ona klasyczne metody spektrofotometryczne i jest preferowana zarówno w rutynowych, jak i naukowych laboratoriach klinicznych (1).

Mimo swoich ogromnych zalet metoda ASA posiada pewne niedogodności. Wymaga utrzymywania ściśle powtarzalnych warunków pomiarowych oraz właściwego przygotowywania prób do analizy. Z ostatnim zagadnieniem wiąże się eliminacja szeregu czynników pogarszających precyzję i dokładność metody.

O ile warunki związane z pomiarem stanowią ogólne zasady pracy ze spektrofotometrem absorpcyjnym i zwykle są przestrzegane, o tyle możliwość wyboru różnych sposobów przygotowywania surowicy (3, 5, 6, 8, 12, 14, 15, 18) jest powodem uzyskiwania często nieporównywalnych wyników. Ta sama przyczy-

na sprawia, że wartości stężeń składników mineralnych określanych w surowicy są w wielu przypadkach bardzo odległe od ich rzeczywistego poziomu (6, 13, 17, 18). Taki stan rzeczy uzasadnia potrzebę porównania stosowanych dotąd sposobów przygotowawczych i wybrania postępowania dającego wyniki najbardziej precyzyjne i dokładne.

Materiał i metody

Do badań wzięto 1600 ml mieszanej surowicy krwi bydłowej. Objętość tę podzielono na 8 jednakowych części (grup) po 100 prób każda.

Stężenie Cu, Zn i Fe oznaczano płomieniową metodą atomowej spektrofotometrii absorpcyjnej po przygotowaniu surowicy wg niżej wymienionych sposobów:

1. grupa prób — surowica bez przygotowania, zasykana wprost do rozpylacza, wg postępowania Rodgerona i Helfera (12);
2. grupa prób — surowica zliofilizowana i rozpuszczona w wodzie do objętości wyjściowej;
3. grupa prób — surowica rozcieńczana wodą w stosunku 1:3 (1 cz. surowicy + 2 cz. wody), wg postępowania Slavina (15);
4. grupa prób — surowica zliofilizowana i rozpuszczona w wodzie w stos. 1:3 (biorąc za podstawę jej objętość przed liofilizacją);
5. grupa prób — surowica mineralizowana „na mokro”, wg procedury podanej przez Sundermana i Roszela (18);

6. grupa prób — surowica mineralizowana „na sucho”, wg Krupińskiego i Saby (6);

7. grupa prób — surowica odbiałczana przy pomocy 10% TCA, wg postępowania Przesmyckiego i Króla (10, 11).

W 8. grupie prób dokonano oznaczeń pierwiastków przy pomocy metod kolorymetrycznych.

Miedź oznaczano wg metody opracowanej przez Wiercińskiego (19), cynk wg postępowania podanego przez Snella (16), a żelazo wg Laubera (7).

Oznaczenia prowadzono na spektrofotometrze absorpcji atomowej EEL240/2 prod. Evans Electro Selenium Ltd — Anglia, metodą krzywej wzorcowej.

Zakresy stosowanych długości fal i prądu lamp:

Cu: 324,7 nm, 7 mA,

Zn: 213,9 nm, 10 mA,

Fe: 248,3 nm, 15 mA.

Pozostałe warunki pomiarowe:

— średnica kapilary: 0,5 mm

— szybkość zasysania: 4 ml/min.

— rozciągnięcie skali absorbancji: 5×

Standardy przygotowywano:

dla 1. i 2. grupy prób — w 12% roztworze dekstranu (M.cz. 110.000)

dla 3. i 4. grupy prób — w 3,5% roztworze dekstranu (Cu i Zn) oraz w 2% roztw. albuminy surowicy wołowej (Fe)

dla 5., 6. i 8. grupy prób — w wodzie

dla 7. grupy prób — w 5% roztworze TCA

Wyniki i omówienie

Wyniki oznaczeń zawartości Cu, Zn i Fe, określanych w surowicy przy pomocy płomieniowej metody ASA po przygotowaniu prób różnymi sposobami, zestawiono w tab. 1. Obok nich — dla każdej grupy prób (sposobu przygotowawczego) — umieszczono wartości odchylenia standardowego obliczonego z serii 100 oznaczeń. Dla porównania zestawiono rezultaty analiz pierwiastków tych samych prób surowicy, uzyskane przy pomocy metod kolorymetrycznych.

Tab. 1. Zawartość Cu, Zn i Fe w próbach surowicy mieszanej, przygotowywanej różnymi sposobami

Grupa prób	Sposób przygotowywania prób surowicy	Cu		Zn		Fe	
		\bar{x}	s	\bar{x}	s	\bar{x}	s
1	bez przygotowania	1,10	0,08	2,28	0,23	1,12	0,13
2	liofilizacja i rozpuszczenie w wodzie do obj. wyjściowej	- a)		- a)		- a)	
3	rozcieńczenie wodą w stos. 1:3	1,18	0,02	2,32	0,08	1,23	0,08
4	liofilizacja i rozpuszczenie w wodzie w stosunku 1:3	1,06	0,05	2,11	0,14	1,21	0,07
5	mineralizacja „na mokro”	1,33	0,06	2,40	0,18	1,52	0,15
6	mineralizacja „na mokro”	1,21	0,09	1,51	0,28	1,86	0,35
7	odbiałczanie z TCA	1,29	0,06	2,53	0,14	1,34	0,12
8	porównawcze metody kolorymetryczne	1,26	0,10	2,21	0,23	1,28	0,06

Objaśnienia: \bar{x} = wartości średnie w mg/ml surowicy; s = odchylenie standardowe; n = 100; a = zbyt duża lepkość roztworów uniemożliwiła zasysanie prób.

Ogólna analiza tych wyników wskazuje, że wszystkie postępowania przygotowawcze surowicy — z wyjątkiem jej mineralizacji „na sucho” — dają dla tych samych pierwiastków śladowych wartości stężeń odległe — od określonych porównawczymi metodami kolorymetrycznymi — nie więcej niż o $\pm 19\%$. Mineralizacja „na sucho” (6 grupa prób), prowa-

dzona w piecu elektrycznym w temp. do 500°C, odbija się ujemnie na zawartości cynku (32% strat) daje zawyżone wyniki w przypadku żelaza (o 45%). Dla wszystkich oznaczanych pierwiastków, takie przygotowywanie prób charakteryzuje się największą wartością odchylenia standardowego. Dane te całkowicie dyskwalifikują mineralizację „na sucho”, jako sposób przygotowywania prób surowicy do oznaczeń w niej Zn i Fe.

Zabezpieczanie surowicy na drodze liofilizacji (2 grupa prób) prowadzi do wzrostu lepkości uzyskanych z niej potem roztworów. Utrudnia to lub wręcz uniemożliwia jej aspirację do rozpylacza, gdy objętość surowicy doprowadzimy do poziomu sprzed procesu sublimacyjnego suszenia. Następstwa liofilizacji pogarszają precyzję oznaczeń także w przypadku, gdy objętość rozpuszczonej pozostałości surowicy uzupełnimy wodą do osiągnięcia stosunku rozcieńczenia 1 : 3 (4 grupa prób).

Pozostałe 3 sposoby przygotowawcze — mineralizacja prób „na mokro” (5 grupa prób), odbiałczanie i uwalnianie określanych składników kwasem trójchlorooctowym (7 grupa prób) oraz postępowanie z rozcieńczeniem surowicy wodą w stos. 1 : 3 (3 grupa prób) — dają bardzo zbliżone rezultaty oznaczeń dla poszczególnych pierwiastków. Spośród tych sposobów — mineralizacja „na mokro” daje najwyższe wartości odchylenia standardowego, co jest zrozumiałe, gdy przyjmie się, iż jest ono najbardziej skomplikowaną procedurą przygotowawczą i stwarza możliwość wprowadzenia zanieczyszczeń z używanymi odczynnikami.

W rezultacie przeprowadzonej eliminacji można brać pod uwagę jedynie dwa sposoby przygotowawcze — postępowanie z wykorzystaniem TCA oraz proste rozcieńczenie prób wodą. Sposoby te, obok stosunkowo najniższych wartości odchylenia standardowego, prowadzą do wyników zgodnych z rezultatami specyficznych metod kolorymetrycznych.

Traktowanie surowicy TCA umożliwia jej odbiałczanie i całkowite uwolnienie pierwiastków śladowych z kompleksów. Z teoretycznego punktu widzenia usunięcie białka wyklucza jego interferencję chemiczną na oznaczane pierwiastki oraz błędy wynikłe z różnic w wydajnościach procesu rozpylenia surowicy i standardów. W praktyce jednak ten sposób przygotowawczy doprowadza do tzw. efektu zmiany objętości surowicy (2), powodując, że w wytrąconym białku składniki drobnocząsteczkowe występują w znacznie niższym stężeniu niż w supernatancie. Nieuwzględnienie tego efektu daje wyniki niedokładne. Oznaczone stężenia pierwiastków surowicy po tej procedurze przygotowawczej są o ok. 9% wyższe od otrzymanych w następstwie rozcieńczenia prób wodą. Większa ilość manipulacji wykonywana podczas odbiałczania prób doprowadza również do uzyskiwania wyników mniej

precyzyjnych (odchylenie standardowe w tym procesie przygotowawczym nie osiąga najniższych wartości).

Przeprowadzona analiza uzyskanych wyników przemawia za wyższością przygotowania prób surowicy, polegającego na ich rozcieńczeniu wodą. Stosując tę prostą procedurę przygotowawczą należy pamiętać o doprowadzeniu lepkości roztworów standardowych do wartości lepkości rozcieńczonej surowicy i uwzględnieniu wpływu pozostałego białka na żelazo. Można to osiągnąć w nieskomplikowany sposób przez dodanie do standardów Cu i Zn dekstranu, glicerolu lub innych koloidów i wzbogacenie roztworów standardowych Fe składnikiem białkowym.

W naszym Laboratorium — oznaczenia Cu i Zn w surowicy rozcieńczonej w stos. 1:3 — prowadziliśmy wobec standardów sporządzonych w 3,5% roztworze dekstranu (M. cz. 110 000). Podczas oznaczeń Fe w surowicy rozcieńczonej wodą w tym samym stosunku, posługiwaliśmy się roztworami standardowymi tego pierwiastka, zawierającymi 2% wolnej od żelaza (przedializowanej) albuminy krwi wołowej. Roztwory zabezpieczano azydkiem sodu w stężeniu 0,05%.

Nie stwierdziliśmy żadnych różnic w poziomie oznaczanych składników w surowicy świeżej i przechowywanej w ciągu 1 tygodnia w temp. 4°C. Okres ten jest wystarczający dla dokonania oznaczeń w dużych seriach prób surowicy i nie zachodzi potrzeba jej innego zabezpieczania przed zmianami.

Wnioski

1. Przygotowanie prób surowicy do oznaczeń Cu, Zn i Fe prowadzonych płomieniową metodą ASA, polegające na rozcieńczeniu ich wodą w stos. 1:3, daje wyniki najbardziej precyzyjne i dokładne, pod warunkiem, że po-

miary prowadzi się wobec standardów posiadających lepkość równą lepkości rozcieńczonej surowicy. W przypadku standardów Fe, substancją ustalającą tę wielkość fizyczną oraz eliminującą różnice w oznaczeniach tych samych poziomów pierwiastka w surowicy i wzorcach, jest albumina surowicy wołowej.

2. Traktowanie surowicy TCA daje rezultaty o podobnym stopniu precyzji i dokładności, z tym zastrzeżeniem, że wprowadzi się poprawkę uwzględniającą nierównomierność rozmieszczenia jonów w osadzie i roztworze.

3. Mineralizacja prób „na sucho” nie może być stosowana jako proces przygotowawczy surowicy do oznaczania w niej Zn i Fe.

Piśmiennictwo

1. Branderberger H.: Clinical Biochemistry — Principles and Methods. Curtius H. Ch., Roth M. red. Walter de Gruyter. Berlin—New York 1974.
2. Bürgi W., Richterich R., Mittelholzer M. L.: Klin. Wschr. 45, 83, 1967.
3. Delves H. T., Shepherd G., Vinter P.: Analyst 96, 260, 1971.
4. Dyla Z., Przesmycki J.: Diagn. Lab. 6, 147, 1970.
5. Enigk K., Feder H., Dey-Hazra A., Weingärtner E.: Zbl. vet. Med. 19, 238, 1972.
6. Krupiński A., Saba L.: Problemy Agrofizyki 12, 120, 1974.
7. Lauber K.: Z. klin. Chem. 3, 96, 1965.
8. Olson A. D., Hamlin W. B.: Atomic Absorption Newsl. 7, 69, 1968.
9. Przesmycki J., Chorąży W.: Diagn. Lab. 6, 61, 1970.
10. Przesmycki J., Król B.: Diagn. Lab. 9, 283, 1973.
11. Przesmycki J., Król B.: Diagn. Lab. 9, 287, 1973.
12. Rodgers D. O., Helfer R. E.: Clin Chem. 12, 338, 1966.
13. Saba L.: Zależność między występowaniem Mn, Fe, Co i Zn w elebrie, roślinności pastwnej i krwi bydła mlecznego na przykładzie dwu fizjograficznie zróżnicowanych miejscowości lubelszczyzny. Praca doktorska AR Lublin 1973.
14. Sapek A.: Problemy Agrofizyki 12, 91, 1974.
15. Slavin W.: Atomic Absorption Newsletter No. 10. Perkin-Elmer Corp. Norwalk, Connecticut. Febr. 1963.
16. Snell F. D., Snell C. T.: Colorimetric Methods of Analysis. D. Van Nostrand Company. Toronto—Princeton—New Jersey—London 1959.
17. Stefens B. J.: Clinical Application of Atomic Absorption Spectroscopy. Varian Techtron PTY, Ltd. Spingvale—Walnut Creek—Zug—Malton 1970.
18. Sunderman F. M., Roszel N. O.: Amer. J. Clin. Pathol. 48, 286, 1967.
19. Wierciński J.: Medycyna Wet. 22, 564, 1966.
20. Willis J. B.: Nature 186, 249, 1960.
21. Willis J. B.: Spectrochim. Acta 16, 259, 1960.
22. Willis J. B.: Spectrochim. Acta 16, 273, 1960.
23. Willis J. B.: Spectrochim. Acta 16, 551, 1960.

Adres autora: doc. dr Janusz Wierciński, ul. Akademicka 13, 20-934 Lublin.

DUBEY J. P.: Odporność u kotów na zakażenie Hammondia hammondi. (Immunity to Hammondia hammondi infection in cats). J. Am. vet. med. Ass. 167, 373—377, 1975 (5).

Nabywanie odporności przez koty po zakażeniu Hammondia hammondi prześledzono na 18 kotach SPF w wieku 3—36 miesięcy. Jedną sztukę zakażono jednorazowo doustnie, 11 sztuk zakażono dwukrotnie i 1 sztukę zakażono trzykrotnie homogenatem tkanek myszek zarażonych pasożytem na drodze naturalnej. U wszystkich zakażonych kotów wydalanie oocyst notowano po 6—9 dniach po zakażeniu. Wydalanie to utrzymywało się przez okres 1—2 tygodni. Z 11 kotów zakażonych dwukrotnie 5 wydalalo oocysty między 7—14 dniem po zakażeniu powtórnym. Spontaniczne wydalanie oocyst prześledzone na 9 zakażonych kotach w okresie 9 miesięcy. Jeden kot wydalal oocysty po 21, 24, 31—33, 49—50, 118—120 dniach po zakażeniu. Drugi kot zakażony dwukrotnie (6 dni po pierwszym zakażeniu) wydalal oocysty po 38—48, 85—89, 133—136 dniach po pierwszym zakażeniu. Przebieg zakażenia prześledzono również u kotów, które otrzymały iniekcje 6-metylprednizolonu w odstępach tygodniowych w okresie 7 tygodni. Induko-

wany w ten sposób hyperadrenokortycyzm nie wpływał zarówno na okres prepatentny jak i na przebieg zakażenia narządów mięsaszowych. G.

WHITLOCK R. H., DELLERS R. W., SHIVELY J. N.: Adenowirusowe zapalenie płuc u źrebęcia. (Adenovirus pneumonia in a foal). Cornell vet., 65, 393—401, 1975 (3).

Badania przeprowadzono na 3 tygodniowym źrebęciu, u którego przed padnięciem występowały objawy zaburzeń ze strony układu oddechowego. Mimo stosowania antybiotyków o szerokim spektrum działania, leków rozszerzających okrzela i preparatów antyhistaminowych źrebę padło. Na czoło zmian sekcyjnych wysuwało się ogniskowe zagęszczenie tkanki płucnej. Badania histopatologiczne wykazały zluszczenie nabłonka oskrzelików, hyperplazję małych oskrzeli i oskrzelików oraz obecność śródjądrowych ciałek wtęrotowych typu A i B Cowdry w komórkach nabłonka oskrzeli i oskrzelików. Wokół drzewa oskrzelowego gromadziły się neutrofile i makrofagi. Śródjądrowe ciała wtęrotowe występowały również w komórkach nabłonka ślinianek i w trzustce. Z wymazów z jamy nosowej i gardzieli oraz z narządów wewnętrznych wyizolowano wirus z grupy adenowirusów. G.