

## Piśmiennictwo

1. Brown C. R., Hartree E. F.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 356, 1909, 1975.
2. Cechova D., Fritz H.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 357, 401, 1976.
3. Fink E., Jaumann E., Fritz H., Ingrish H., Werle E.: Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 1591, 1971.
4. Hirschhauser C., Klonke M.: Fert. Steril. 21, 360, 1971.
5. Hirschhauser C., Baudner S.: Fert. Steril. 23, 393, 1973.
6. Polakoski K. L., Zaneveld L. J. D., Williams W. L.: Biochem. biophys. Res. Commun., 45, 381, 1971.
7. Stambaugh R., Brackett B. G., Mastroianni L.: Biology Reprod. 1, 223, 1969.
8. Stambaugh R., Smith M.: Science 186, 745, 1974.
9. Strzeżek J., Smigielska J. D., Taha Jassim Al-Taha: Medycyna Wet. (oddano do druku, 1978 r.).
10. Suominen J. J. O., Niemi M.: Reprod. Fert. 29, 163, 1972.
11. Suominen J. J. O., Satchell B. P.: Repr. Fert. 30, 235, 1972.
12. Tauber P. F., Zaneveld L. J. D., Propping D., Schumacher G. F. B.: J. Reprod. Fert. 46, 165, 1976.
13. Wendt V., Schleming W. D., Schill W. B., Tscheschett W., Fritz H.: Proc. VIII Congr. Anim. Reprod. 4, 947, 1976.
14. Zaneveld L. J. D., Srivastava P. N., Williams W. L.: J. Reprod. Fert. 20, 337, 1969.
15. Zaneveld L. J. D., Srivastava P. N., Williams W. L.: Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 133, 1172, 1970.
16. Zaneveld L. J. D., Robertson R. T., Kesler M., Williams W. L.: J. Reprod. Fert. 25, 387, 1971.
17. Zaneveld L. J. D., Dragoje B. M., Schumacher G. F. B.: Science 177, 702, 1972.
18. Zaneveld L. J. D., Polakoski K. L., Williams W. L.: Biology Reprod. 9, 219, 1973.
19. Zaneveld L. J. D., Schumacher G. F. B., Gritz H., Fink E., Jaumann E.: J. Reprod. Fert. 32, 525, 1973.

Adres autora: dr Jadwiga Smigielska, 10-718 Olsztyn-Kortowo, bl. 37, p. 226.

Смигельская Я., Стшежек Е. — Активность ингибиторов акросина в плазме во время замораживания семени быков в жидком азоте.

На отдельных этапах замораживания семени быков определяли активность ингибиторов акросина в плазме или в надосадочной жидкости пользуясь спектрофотометрическим методом.

Обнаружили значительно низшую исходную активность ингибиторов акросина в плазме семени молодых быков по сравнению с быками-производителями. У животных обеих групп показали отчетливый рост активности ингибиторов на отдельных этапах технологии замораживания семени. Наблюдаемые изменения вроде указывают на криобиохимическое повреждение живчиков. В результате этих изменений следует „вытекание” ингибиторов из акросом или их отщепление от плазматических оболочек живчиков.

Śmigielska J., Strzeżek J. — The activity of acrosine inhibitors in semen plasma in the course of freezing of bull's semen in a liquid nitrogen.

The activity of acrosine inhibitors in semen plasma and supernatant was determined spectrophotometrically on various stages of bull's semen freezing.

It was found a significantly lower initial activity of acrosine inhibitors in the semen of young bulls in comparison to that in reproducers. In both groups of animals there was noted a clearly marked increase of the activity of the inhibitors on particular stages of semen freezing. The observed changes can point to cryobiochemic destruction of spermatozoons, causing a leak of acrosine inhibitors of their detaching from plasmatic membranes of spermatozoons.

## PRAKTYKA LABORATORYJNA

STEFAN STEPKOWSKI, STANISŁAW KLIMONT

### Obserwacje nad hodowlą *in vitro* *Histomonas meleagridis* (Smith, 1895)

Z Zakładu Chorób Drobiu Instytutu Chorób Zakaźnych i Inwazyjnych Wydziału Weterynaryjnego AR w Lublinie

Zagadnienie namnażania *in vitro* wiciowca *Histomonas meleagridis* (Smith, 1895), etiologicznego czynnika zakaźnego zapalenia jelit ślepych i wątroby u ptaków grzebiących, było przedmiotem badań od dość dawna. Pierwsze próby w tym kierunku podjął w 1924 r. Drbohlav (cyt. 13). Badacz ten sporządził do namnażania *H. meleagridis* podłoże dwufazowe, w którym fazę stałą stanowił koagulat białka jaja kurzego lub agar odżywczy a fazę płynną bulion mięsny wzgl. płyn Locke'a. Podłoże Drbohlava zmodyfikował Tyzzer (cyt. 13), używając jako fazy płynnej surowicę końską, wzbogaconą dodatkiem skrobi ryżowej. Z kolei Bayon i Bishop (cyt. 13) przygotowali pożywkę jednofazową, którą stanowiła surowica bydleca, rozcieńczona płynem Ringera. Następnie DeVolt (cyt. 13) zastosował do namnażania *H. meleagridis* płyn Locke'a, zalkalizowany przy pomocy NaOH i wzbogacony surowicą indyczą oraz skrobią ryżową; sporządzona przez DeVolta pożywka zale-

cana jest przez niektórych autorów do dziś (16). Nieco później Delappe wykorzystał do hodowli *H. meleagridis* podłoże, przygotowane przez Dobella i Laidlawa do namnażania *Entamoeba histolytica* (2, cyt. 13).

Nowych możliwości namnażania *in vitro* *H. meleagridis* dostarczyły podjęte w 1960 r. obserwacje Lessera (8). Badacz ten pierwszy wykorzystał do hodowli wiciowca płyn tkankowy Parkera, wzbogacony surowicą i skrobią ryżową (9). Na tej pożywce Lund i wsp. (14) utrzymywał *H. meleagridis* w hodowli *in vitro* przez ponad 1000 przesiewów. Późniejsze obserwacje Lessera wykazały zależność namnażania się *H. meleagridis* od występowania w posiewach i rodzaju flory bakteryjnej (11, 12), której zniszczenie pociąga zwykle za sobą, co wykazało wielu badaczy, obumieranie wiciowca (1, 4, 5, 6, 14). Niemniej Lesser po zastosowaniu pożywki, zawierającej poza płynem Parkera, surowicą i skrobią ryżową również jony

niektórych metali oraz wycinki wątroby dziewczej samiczki chomika syryjskiego, uzyskał bezbakteryjną hodowlę *H. meleagridis* (10).

Pożywkę Lessera do hodowli agnotobiotycznej *H. meleagridis* zmodyfikował Dwyer (3), który dodatkowo użył do jej wzbogacenia wyciągu z zarodków kurzych (CEE). Na pożywce Dwyera *H. meleagridis* namnażał się wyjątkowo obficie. Wkrótce potem McDougald i Galloway wykazali, że pożywka Dwyera może być przydatna w wykrywaniu stanu zarażenia tym wiciowcem u indycząt i kurcząt (15).

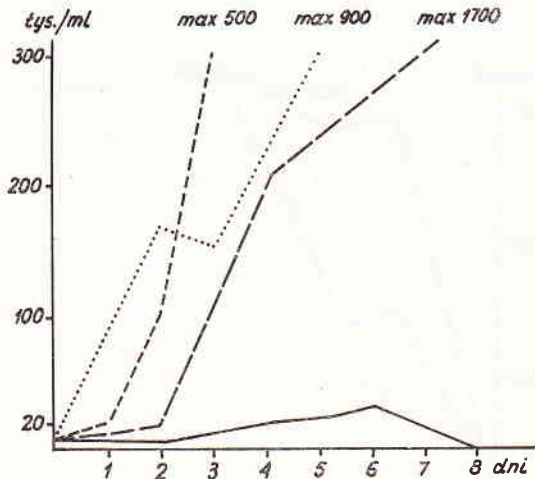
W 1974 r. Stępkowski (17) w próbach izolowania *H. meleagridis* od padłych wskutek histomonadozy ptaków uzyskiwał częściej występowanie wiciowca w pożywce, opartej na podłożu Eagle'a MEM 1959 niż w pożywce Dwyera. Poza podłożem Eagle'a pożywka zawierała te same substancje wzbogacające, jakich użył Dwyer tj. surowicę, CEE oraz skrobię ryżową. Powyższe obserwacje stały się bodźcem do podjęcia zakrojonych na szerszą skalę badań, których głównym celem było dokładniejsze ustalenie pożywki z podłożem Eagle'a do namnażania *in vitro* *H. meleagridis*.

**Materiał i metody**

W badaniach użyto 3 szczepy własne *H. meleagridis* (Hm-IH, Hm-K, Hm-10), wyizolowane z przypadków histomonadozy od indyków. Poza wiciowcem w hodowlach tych szczepów stwierdzono następujące drobno-ustroje: *E. coli* i *Str. faecalis* (wszystkie 3 szczepy), *B. subtilis* (szczep Hm-IH), *Proteus vulgaris* (szczep Hm-K) oraz *Klebsiella* sp.

W części dotyczącej intensywności namnażania się *H. meleagridis* na pożywce z podłożem Eagle'a w ce-

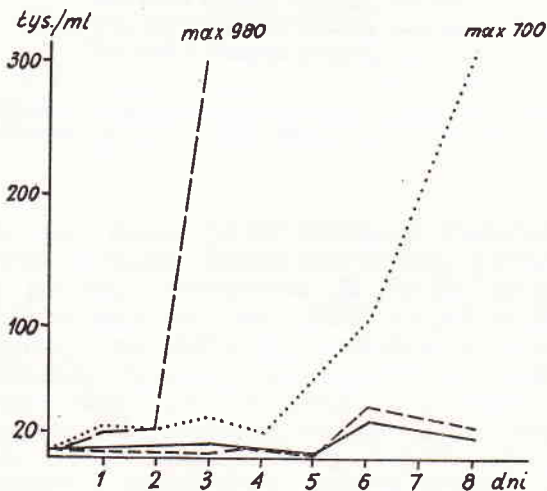
lach porównawczych włączono do badań pożywki DeVolta, Dobell-Laidlawa oraz Dwyera. Sposób wzbogacania pożywki z podłożem Eagle'a i pożywki Dwyera był ten sam (10% surowicy bydlęcej, 5% CEE, 1-1,2 mg/ml skrobi ryżowej f-my Difco). Podłoże Eagle'a oraz płyn Parkera pochodziły z Lubelskiej Wytwórni Surowic i Szczepionek. Wyciąg z zarodków kurzych (CEE) sporządzano we własnym zakresie wg metody podanej przez Larskiego (7). Gotową do posiewu pożywkę wlewano w ilości 3 ml do próbek aglutynacyjnych o wymiarach 10x100 mm, które zatykano korkami z waty. Liczbę namnożonych wiciowców określano, po dokładnym zmieszaniu osadu z płynną częścią pożywki, przy pomocy komory Bürkera.



**Objaśnienia:**

- podłoże Eagle'a + 1% surowicy bydlęcej
- - - podłoże Eagle'a + 5% surowicy bydlęcej
- ..... podłoże Eagle'a + 10% surowicy bydlęcej
- · - podłoże Eagle'a + 20% surowicy bydlęcej

Ryc. 2. Wpływ różnych stężeń surowicy na namnażanie się *H. meleagridis* w podłożu Eagle'a



**Objaśnienia:**

- pożywka Dobell-Laidlawa
- - - pożywka DeVolta
- ..... pożywka Dwyera
- · - pożywka z podłożem Eagle'a
- max - namnożenie maksymalne

Ryc. 1. Namnażanie się *H. meleagridis* na wybranych pożywkach

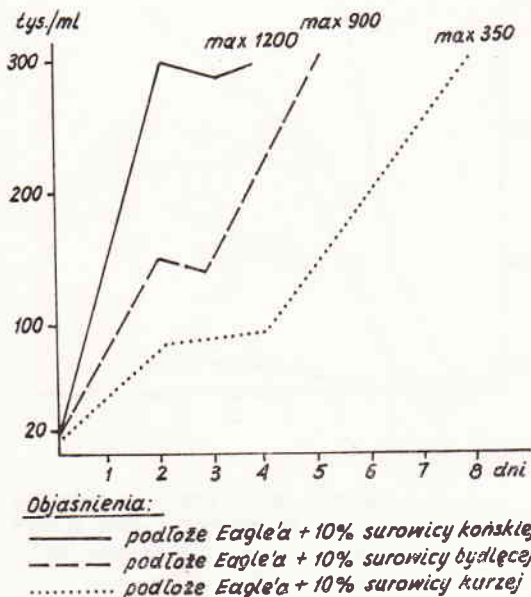
**Wyniki i omówienie**

Dane liczbowe, obrazujące intensywność namnażania się *in vitro* *H. meleagridis* na 4 różnych pożywkach wykazały olbrzymią przewagę obu pożywek z płynami tkankowymi (Parker Nr 199, Eagle MEM 1959) nad pożywką DeVolta oraz Dobell-Laidlawa (ryc. 1). Poza wielokrotnie silniejszym namnożeniem się wiciowca również jego przeżywalność na pożywkach z płynami tkankowymi była dłuższa. Pożywka z podłożem Eagle'a górowała wyraźnie nad pożywką Dwyera, opartą na płynie Parkera: faza szczególnie intensywnego namnażania się *H. meleagridis* występowała na pierwszej z nich już po upływie 2 dni, na drugiej dopiero po upływie 4 dni od posiewu a ponadto namnożenie się wiciowca na pożywce z podłożem Eagle'a było silniejsze niż na pożywce Dwyera. Większa przydatność do hodowli *H. meleagridis* podłoża Eagle'a w porównaniu z płynem Parkera przejawiała się również w tym, że namnoże-

nie pierwotniaka można było na nim uzyskać po dodaniu któregośkolwiek ze składników wzbogacających: surowicy, CEE lub skrobi (ryc. 2, 4, 5). W analogicznych próbach z płynem Parkera, namnażanie się *H. meleagridis* następowało jedynie po dodaniu surowicy, natomiast w płynie Parkera wzbogaconym przez dodatek tylko CEE lub tylko skrobi, wiciowiec nie namnażał się, lecz szybko obumierał. Wyniki tych obserwacji wskazywały jednocześnie na surowicę jako szczególnie ważny czynnik, stymulujący namnażanie się *in vitro* *H. meleagridis*.

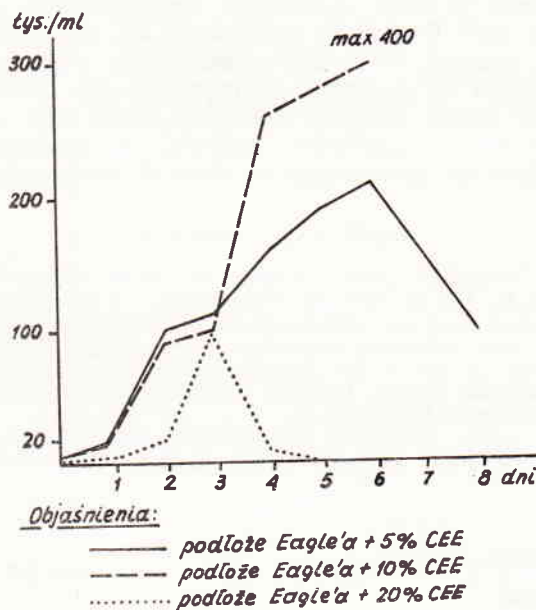
wało po wzbogaceniu podłoża Eagle'a w surowicę końską, nieco mniej liczne po dodaniu surowicy bydłowej, natomiast surowica kurza powodowała najwolniejsze i najsłabsze namnażanie się pierwotniaka (ryc. 3).

W następnym etapie badań starano się ustalić optymalne dla wzrostu *H. meleagridis* stężenie wyciągu z zarodków kurzych (CEE), uzyskując najlepsze rezultaty z koncentracją 10% wyciągu (ryc. 4). Stopień stymulacyjnego oddziaływania CEE na wzrost wiciowca był zbliżony w tym stężeniu do działania surowicy kurzej (ryc. 3), przewyższając jednak kilkakrotnie stymulacyjny wpływ skrobi ryżowej, dodanej w zalecanej przez Tyzlera (cyt. 3) ilości 1—1,2 mg na ml (ryc. 5).



Ryc. 3. Namnażanie się *H. meleagridis* w podłożu Eagle'a z surowicą konia, krowy i kury

Dalsze obserwacje miały na celu oznaczenie optymalnego dla hodowli *H. meleagridis* w po-



Ryc. 4. Wpływ różnych stężeń wyciągu z zarodków kurzych (CEE) na namnażanie się *H. meleagridis*

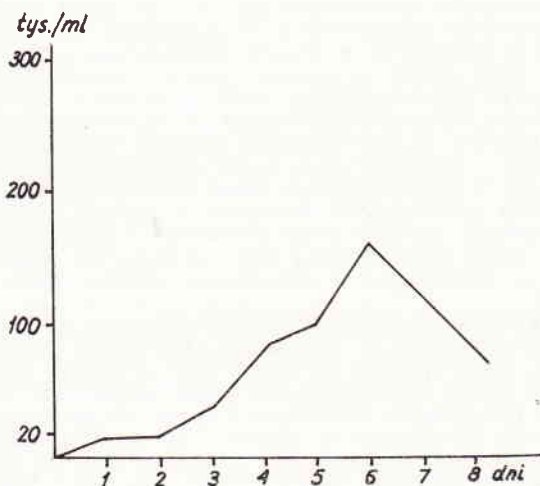
żywe z podłożem Eagle'a stężenia surowicy. W tym celu tę samą liczbę wiciowca (5000 osobn. w 1 ml) wprowadzano do probówek, zawierających oprócz podłoża Eagle'a 4 różne stężenia surowicy bydłowej: 1%, 5%, 10% i 20%, przy czym w probówce kontrolnej znajdowało się podłoże Eagle'a bez surowicy i innych czynników wzbogacających. Z kolei określano w odstępach 24 godz. liczbę wiciowców w każdym ze stężeń, inkubowanych w temp. 38°C. Faza intensywnego namnażania się *H. meleagridis* występowała najszybciej (w ciągu kilku godzin od dokonania posiewu) przy stężeniu 10% surowicy, natomiast najsilniejsze namnożenie się pierwotniaka wykazało stężenie 20% surowicy (ryc. 2).

W tej części badań dokonano również oceny przydatności dla hodowli *in vitro* *H. meleagridis* surowicy konia, krowy i kury. Najszybsze i najliczniejsze namnożenie wiciowca następo-

Rezultaty opisanych wyżej badań stały się podstawą opracowania dwóch własnych pożywek do hodowli *H. meleagridis*, opartych na podłożu Eagle'a MEM 1959. Pierwsza z nich, oznaczona symbolem ES, składa się z podłoża Eagle'a oraz 10% surowicy końskiej lub bydłowej. Pożywka ta, łatwa do sporządzenia, winna okazać się szczególnie przydatną dla codziennej, rutynowej diagnostyki histomonadozy ptaków, ułatwia bowiem stwierdzenie z pomocą hodowli w stosunkowo krótkim czasie występowania wiciowca. Druga wersja pożywki z podłożem Eagle'a, oznaczona jako pożywka ESCEE, różni się od pożywki ES dodatkiem 10% wyciągu z zarodków kurzych. Pożywka ESCEE może być użyta, podobnie jak pożywka ES, do diagnostyki histomonadozy a ponadto do intensyfikacji w razie potrzeby namnażania się *H. meleagridis*, do regeneracji szczepów te-

go wiciowca, przechowywanych w płynnym azocie itp.

Dla uproszczenia składu obu pożywek zrezygnowano z dodatku skrobi ryżowej, której stymulujące działanie na wzrost ilościowy *H. meleagridis* w naszych badaniach okazało się niewielkie w porównaniu z działaniem surowicy i CEE.



Ryc. 5. Wpływ skrobi ryżowej (1 mg/ml) na namnażanie się *H. meleagridis* w podłożu Eagle'a

Pożywki ES oraz ESCEE najlepiej przygotowywać na świeżo, tuż przed ich użyciem. Przechowywanie połączone jest ze zmianą odczynu pożywek z pH=7,3 (które po posiewie w warunkach agnotobiotycznych szybko ulega obniżeniu poniżej obojętnego) na wzrastający w miarę upływu czasu odczyn zasadowy. Zjawisko alkalizacji pożywki jest niekorzystne dla hodowli *in vitro* *H. meleagridis*, którego optimum namnażania się wynosi wg Lessera pH = 5,8—6,8 (8). Z naszych obserwacji wynika, że procesowi zmiany odczynu pożywek na zasadowy można w pewnym stopniu przeciwdziałać przez użycie do zatykania próbek korków kauczukowych, zabezpieczających pożywkę przed utleniającym działaniem powietrza (tab. 1). Użycie korków kauczukowych w miejsce korków z waty i gazy ułatwia wiciowcowi namnażanie się i opóźnia proces jego obumierania po namnożeniu.

Tab. 1. Wpływ przechowywania na zmianę odczynu (pH) pożywek ES i ESCEE

Korek	Czas w godzinach					
	0	24	48	72	96	120
	pH					
Guma	7,3	7,3	7,3	7,35	7,35	7,4
Gaza	7,3	7,6	7,8	7,95	8,25	8,6

Wnioski

1. Pożywki, oparte na płynach tkankowych (Parker 199, Eagle MEM 1959) są bardziej przydatne do hodowli *in vitro* *Histomonas meleagridis* niż niektóre inne pożywki jednofazowe (pożywka De Volta, żywka Dobell-Laidlaw).

2. Własne pożywki ES oraz ESCEE z podłożem Eagle'a stwarzają lepsze warunki dla namnażania *in vitro* *H. meleagridis* niż żywka Dwyera, oparta na płynie Parkera.

3. Pożywki ES i ESCEE należy przygotowywać *ex tempore* a dokonane na te żywki posiewy winno się zabezpieczać przed dostępem powietrza.

Piśmiennictwo

- Bradley R. E., Reid W. M.: Expl. Parasit. 19, 91, 1966.
- Delappe P.: Expl. Parasit. 2, 79, 1953.
- Dwyer D. M.: J. Parasit. 56, 191, 1970.
- Goedbloed E., Bool P. H.: Avian Dis. 6, 302, 1962.
- Harrison A. P. Jr., Hansen P. A., DeVolt H. M., Holst A. P., Tromba F. S.: Poul. Sci. 33, 84, 1954.
- Jensen W. J.: A study of *Histomonas meleagridis* in culture and in the tissues of the host. Dys. dokt., Cornell Univ., 1951 (wg Vet. Bull. 22, 1288, 1952).
- Larski Z.: Wirusologia weterynaryjna. PWRiL, Warszawa 1965.
- Lesser E.: J. Parasit. 46, 271, 1960.
- Lesser E.: J. Parasit. 46, 686, 1960.
- Lesser E.: J. Protozool. 8, 228, 1961.
- Lesser E.: Proc. helminth. Soc. Wash. 31, 263, 1964.
- Lesser E.: Proc. helminth. Soc. Wash. 31, 265, 1964.
- Lund E. E.: Histomoniasis. In Brandly C. A. and Cornelius C. E.: Advance in Veterinary Science and Comparative Medicine. Academic Press., New York, 3, 355, 1969.
- Lund E. E., Augustine P. C., Chute A. M.: J. Parasit. 14, 349, 1967.
- McDougal L. R., Galloway A. B.: Avian Dis. 17, 847, 1973.
- Stefański W., Zarnowski E.: Rozpoznawanie inwazji pasożytniczych u zwierząt. PWRiL, Warszawa 1971.
- Stepkowski S.: Obserwacje nie opublikowane 1974 r.

Adres autora: prof. dr Stefan Stepkowski, ul. Langiewicza 3/6, 20-032 Lublin.

Степковский С., Климент С. — Наблюдения за культурой *in vitro* *Histomonas meleagridis* (Smith, 1895).

Авторы отметили намного большую пригодность для размножения *in vitro* *Histomonas meleagridis* питательных сред с тканевыми жидкостями (Parker 199, Eagle MEM 1959) чем некоторых других однофазных субстратов (питательная среда DeVolta, питательная среда Dobell-Laidlaw). На питательной среде с субстратом Eagle'a, содержащей те же обогащающие вещества, что опирающаяся на жидкость Parkera питательная среда, изготовленная Dwyer'ом, жгутиковые размножались быстрее и до большего количества. Опираясь на субстрат Eagle'a, авторы разработали для культуры *in vitro* *H. meleagridis* две собственные питательные среды: ES и ESCEE, оказавшиеся при упрощенном составе ценными для диагностики инфекций этими жгутиками у птиц.

Stepkowski S., Klimont S. — Observations on the culture of *Histomonas meleagridis* (Smith, 1895) *in vitro*.

The authors found that the usefulness of media with tissue culture fluids (Parker's medium 199, Eagle's MEM 1959) for multiplication of *Histomonas meleagridis* was much higher than those of de Volt's or Dobell-Laidlaw's. On the medium with Eagle's fluid containing the same enriching substances as Parker's medium prepared by Dwyer the parasite grew faster and better. On the basis of Eagle's medium the authors elaborated two own growth media, i. e. ES and ESCEE which proved to be of great value for diagnostic examinations of birds.