

Houszka M., Mazurkiewicz M. — **Keratoconjunctivitis in hens due to an increased content of ammonia in the air of hen house air.**

The authors have described keratoconjunctivitis occurring in two farms of laying hens, which was caused by increased ammonia content in the hen house air. Besides the clinical and sectional symptoms

typical for this disease, characteristic histological changes of the cornea were found. They were demonstrated by the formation of necrobiotic foci and calcification of the anterior epithelium of the cornea and Bowman's membrane. Calcium lamellae formed were observed to penetrate the cornea itself, evoking a strong interstitial inflammation. The changes described were accompanied by conjunctivitis.

HIPOLIT MACHOY, MARIAN GRUNDBOECK

## Bezpośrednie oznaczanie liczby limfocytów przy użyciu mikroskopu z kontrastem fazowym w diagnostyce białaczki bydła

Z Wojewódzkiego Zakładu Weterynarii w Lesznie  
Z Pracowni Patologii Komórkowej Instytutu Weterynarii w Puławach

W hematologicznym rozpoznawaniu enzootycznej białaczki bydła pierwszorzędne znaczenie posiada liczba limfocytów w 1  $\mu$ l krwi. Na tej wartości oparte zostały liczne klucze białaczkowe jak np. klucz kopenhaski (1), getyndzki (7), europejski (cyt. 2), czechosłowacki (6) itp. Również w Polsce hematologiczna diagnostyka białaczki opiera się na określeniu bezwzględnej liczby limfocytów (9, 10). W związku z tym bardzo ważny jest wybór metody, przy pomocy której oznaczana będzie ta wartość. Najczęściej wyznacza się ją na podstawie ogólnej liczby leukocytów, określonej przy użyciu komory Bürkera i procentu limfocytów obliczonego w rozmazie krwi barwionym metodą Pappenheima. Pracochłonność i czasochłonność tego postępowania zostaje znacznie zmniejszona przy zastąpieniu komory Bürkera elektronicznym licznikiem krwinek. Tym niemniej, mikroskopowa analiza rozmazu stanowi w dalszym ciągu znaczne obciążenie dla personelu laboratoryjnego. Nadto oznaczenie procentu limfocytów w powszechnie przyjęty sposób na podstawie 100 białych krwinek jest źródłem znacznej niedokładności wyników (8). W związku z tym czynione były i nadal są czynione próby bezpośredniego oznaczania bezwzględnej liczby limfocytów. Grundboeck (3, 4) użył do tego celu standardowych kropelek krwi, które były nanoszone na szkiełka mikroskopowe a następnie hemolizowane i barwione. Kupsch i wsp. (5) oznaczali omawianą wartość metodą mikroskopową w komorze do liczenia krwinek, do których wprowadzono zawiesinę leukocytów wybarwionych fioletem goryczki.

Przedstawiona w tej pracy metoda nawiązuje do wyżej wymienionej metody autorów z NRD, wprowadzając jednak w miejsce barwienia komórek mikroskopowy kontrast fazowy.

Oceny tej metody, która w dalszym ciągu pracy będzie nazywana LKF (metoda liczenia w kontraście fazowym), dokonano na podstawie

zestawienia z powszechnie przyjętą metodą klasyczną, opartą na komorze Bürkera, barwionym rozmazie i zwykanej optyce mikroskopowej.

### Opis metody

Postępowanie. Do badania używa się krwi zabezpieczonej od krzepnięcia zgodnie z obowiązującą instrukcją (10).

Do próbki zawierającej 0,38 ml 1% kwasu octowego lub płynu Türka wprowadza się 0,02 ml krwi uzyskując rozcieńczenie 1:20. Po wymieszaniu zawartości przenosi się zawiesinę do komory Bürkera. Po opadnięciu krwinek na dno komory oblicza się na powierzchni 2 mm<sup>2</sup> osobno liczbę wszystkich białych ciałek oraz osobno liczbę limfocytów, przy pomocy mikroskopu z dodatnim kontrastem fazowym używając powiększenia 300-krotnego. Procent limfocytów oblicza się według wzoru:

$$\% \text{ limf.} = \frac{\text{limf}}{\text{leuk}} \times 100$$

Morfologia białych krwinek w obrazie kontrastowo-fazowym

#### Limfocyty:

- komórki małe, z jądrami optycznie jednolitymi, silnie załamującymi światło,
- komórki o podobnych wymiarach co poprzednie, z jądrem optycznie pustym o odcieniu niebieskawym, z silnie załamującymi światło ziarnami, rozmieszczonymi w obwodowej części komórki,
- komórki w porównaniu z poprzednimi większe, jądro mniej załamujące światło, w centralnym punkcie „rozrzedzone”, sprawiające wrażenie pilśni.

Granulocyty: komórki duże z wyraźnie płatowatymi jądrami. Wyróżnia się granulocyty obojętnochłonne (z jądrem segmentowanym, pałeczkowatym i metamielocyty) oraz eozynochłonne z widoczną ziarnistością w zarodku.

Monocyty: komórki duże o jądrami słabo zaznaczonych, wykazujących charakterystyczny, płatowaty kształt.

### Ocena wiarygodności i wartości metody

Wielkość i powtarzalność wyników przy dokonywaniu szeregu oznaczeń w tej samej próbce. W próbce krwi zawierającej 16 000 białych krwinek w 1  $\mu$ l wykonano około 30 oznaczeń liczby limfocytów oraz procentu tych komórek metodą klasyczną oraz metodą LKF. Następnie obliczono dla uzyskanych wartości średnie arytmetyczne, odchylenia standardowe w próbie, współczynniki zmienności oraz wartości t i F do

badania istotności różnic testem t Studenta oraz testem różniczy dwóch wariancji (tab. 1).

Wyniki z nich, że różnice między wartościami uzyskanymi porównanymi metodami są bardzo małe, a jeśli chodzi o liczbę limfocytów to różnice są statystycznie nieistotne. Istotną różnicę stwierdzono testem F w odchyleniach standardowych. Mniejsze odchylenie standardowe w grupie wyników uzyskanych metodą LKF świadczy, że metoda ta dostarcza wyników dokładniejszych w porównaniu z klasyczną.

Tab. 1. Liczba i procent limfocytów w krwi oznaczone metodą klasyczną i LKF

Metoda	Liczba/ $\mu$ l krwi		Procent	
	klasyczna	LKF	klasyczna	LKF
Ilość badań	29	30	31	31
Średnia wartość	14,7	14,4	86,8	86,8
Odchyl. standard.	1,75	1,25	4,72	2,41
Współ. zmienn.	11,9	8,7	5,4	2,8
Test t	$t_{obl.}$	0,94		
	$t_{0,05}$	1,96		
Test F	$F_{obl.}$	1,96		
	$F_{0,05}$	1,84		

Nie obliczono

Porównanie liczby i procentu limfocytów oznaczonych metodą klasyczną i LKF w próbach krwi o różnym poziomie białych krwinek

Do badań użyto 178 prób krwi bydła, dzieląc je na cztery grupy według liczby białych krwinek w 1  $\mu$ l: 7 — 12 tys., 12 — 16 tys., 16 — 22 tys., powyżej 22 tys. Liczebności poszczególnych grup podano w tab. 2 i tab. 3.

W próbach tych oznaczono liczbę limfocytów oraz procent tych komórek metodą klasyczną i LKF. Dla uzyskanych wartości obliczono charakterystyki statystyczne w podobny sposób jak w poprzednim doświadczeniu.

Wyniki dotyczące bezwzględnej liczby limfocytów podano w tab. 2. Świadczą one, że różnice między średnimi wartościami liczby limfocytów są statystycznie nieistotne. Odchylenia standardowe w grupach wyników uzyskanych metodą LKF były z reguły mniejsze, a w jednym przypadku różnica była statystycznie znamienna. Świadczy to, że metoda LKF jest w porównaniu z metodą klasyczną precyzyjniejsza. Do podobnych wniosków skłaniają również dane dotyczące procentu, przedstawione w tab. 3. Średnie obliczone z procentów są również podobne, a odchylenia standardowe są z reguły mniejsze.

Hematologiczne rozpoznawanie białaczki w oparciu o metodę klasyczną i LKF

Do badań użyto 401 prób krwi bydła w różnym wieku, wykazujących podwyższony poziom białych krwinek. Oznaczono w nich liczbę limfocytów metodą klasyczną i metodą LKF a uzyskane wyniki poddano ocenie przy użyciu getyndzkiego klucza białaczkowego. Uzyskano w ten sposób trzy grupy zwierząt — niepodejrzanych o białaczkę, podejrzanych o białaczkę i białaczkowych. Liczebności tych grup określone na podstawie wyników uzyskanych metodą klasyczną porównano z analogicznymi liczebnościami opartymi o wyniki uzyskane metodą LKF. Stwierdzone różnice poddano analizie statystycznej. Uzyskane wyniki zestawiono w tab. 4.

Uwidocznione wartości świadczą, że liczby limfocytów wyznaczone w oparciu o jedną i drugą metodę dostarczyły podstaw do rozpoznania podobnej liczby niepodejrzanych o białaczkę, podejrzanych o białaczkę

Tab. 2. Porównanie liczby limfocytów oznaczonej metodą klasyczną i LKF w krwi bydła o różnym poziomie leukocytów

Metoda badania	7 000—12 000		12 000—16 000		16 000—22 000		ponad 22 000		
	klasycz.	LKF	klasycz.	LKF	klasycz.	LKF	klasycz.	LKF	
Ilość badań	75	75	44	44	37	37	22	22	
Średnia wartość liczby limfocytów	6,1	6,2	10,4	10,4	15,1	15,5	24,3	24,8	
Odchylenie standardowe	1,63	1,68	1,86	1,66	2,92	2,20	3,64	4,55	
Współczynnik zmienności	26,7	27,1	17,8	16,1	16,3	14,2	15,0	18,3	
Test F	$F_{obl.}$	1,03		1,27		1,76		1,56	
	$F_{0,05}$	1,35		1,69		1,69		2,12	
Test t	$t_{obl.}$	0,66		0,70		0,66		0,37	
	$t_{0,05}$	1,99		2,01		2,02		2,07	

Tab. 3. Porównanie procentów limfocytów oznaczanych metodą klasyczną i LKF w krwi bydła o różnym poziomie leukocytów

Metoda badania	7 000—12 000		12 000—16 000		16 000—22 000		ponad 22 000	
	klasycz.	LKF	klasycz.	LKF	klasycz.	LKF	klasycz.	LKF
Ilość badań	75	75	44	44	37	37	22	22
Średnia wartość procentu limfocytów	63,7	64,1	76,3	76,1	82,3	83,5	88,3	87,7
Odchylenie standardowe	12,39	14,43	10,57	8,78	9,93	8,09	4,27	4,83
Współczynnik zmienności	19,45	22,52	13,85	11,53	12,06	9,69	4,84	5,51

Tab. 4. Ilość niepodjętych o białaczkę, podejrzanych o białaczkę i białaczkowych krów, wykazujących podwyższony poziom leukocytów rozpoznanych na podstawie badań metodą klasyczną i LKF

Wyszczególnienie		Met. klasyczna	LKF	Wartość t
Ilość badań		401	401	
Zwierzęta	niepodjęte	119	98	1,67
	podejrzane	107	117	0,79
	białaczkowe	175	186	0,78

i białaczkowych zwierząt. Różnice okazały się statystycznie nieznamiennie na poziomie istotności 0,05.

Następnie omawiane grupy zwierząt określone na podstawie metody LKF przeanalizowano w oparciu o wyniki metody klasycznej. Tab. 5 wskazuje, że ujemny wynik uzyskany jedną metodą odpowiada w większości przypadków ujemnemu wynikowi wykazanemu w oparciu o drugą metodę. Podobne stwierdzenie dotyczy również wyników dodatnich. Godny podkreślenia jest fakt, że ani jeden przypadek ujemny w oparciu o metodę LKF nie był zakwalifikowany jako dodatni przy badaniu metodą klasyczną. Ogólnie metoda LKF wydaje się być bardziej rygorystyczna niż metoda klasyczna, czego jednak nie udało się udowodnić metodami statystycznymi.

bezwzględnej wartości jak i precyzji. W związku z tym zlecono trzem pracownikom laboratoryjnym wykonanie po 20 oznaczeń liczby i procentu limfocytów w losowo wybranej próbie krwi krowy białaczkowej. Z uzyskanych wyników obliczono średnie i odchylenia standardowe oraz współczynniki zmienności. Odchylenia standardowe porównano statystycznie testem Hartley'a. Wyniki zestawiono w tab. 6. Wskazują one, że wszyscy pracownicy uzyskali podobne wyniki zarówno pod względem ich wartości, jak i wielkości rozrzutu. Różnice między odchyleniami standardowymi okazały się statystycznie nieznamiennie.

Organizacja badań i ocena czasochłonności metody LKF. W praktycznym zastosowaniu metody LKF do pracy winny przystąpić dwie osoby, z których jedna nakłada do komory rozcieńczenia badanej krwi w 1% kwasie octowym oraz zapisuje wyniki liczenia, druga oblicza limfocyty i leukocyty przy użyciu mikroskopu. Przy dużych seriach po pewnym czasie pracownicy zamieniają się stanowiskami pracy. Stosując taką organizację pracy oznaczono czas badania liczby leukocytów i limfocytów serii 66 prób. Liczba leukocytów w tej serii wynosiła przeciętnie 8400 z odchyleniem standardowym 4300. Czas badania całej serii wynosił 1 godz. i 20 min. Zatem na dokonanie obliczeń w jednej próbie potrzebowano 1 min i 20 sek. Przyjmując, że analogiczne oznaczenia w jednej próbie metodą klasyczną wymaga około 15 minut, metoda LKF jest kilkakrotnie szybsza. Stwierdzono, że przy pomocy metody LKF dwie osoby mogą wykonać 250 — 300 oznaczeń liczby limfocytów w ciągu 7 godzinnego dnia pracy.

Tab. 5. Liczba krów niepodjętych, podejrzanych o białaczkę i białaczkowych według badań hematologicznych metodą LKF w porównaniu z metodą klasyczną

Wg metody LKF	Niepodjęte			Podejrzane			Białaczkowe		
Liczba zwierząt	98			117			186		
Wg metody klasycznej	niepodjęte	podejrzane	białaczkowe	niepodjęte	podejrzane	białaczkowe	niepodjęte	podejrzane	białaczkowe
Liczba zwierząt	74	24	0	42	66	9	3	17	166

Porównanie wyników badania uzyskanych przez różnych pracowników stosujących metodę LKF. O przydatności metody badania decyduje między innymi i to, czy różne pracownie względnie różne osoby uzyskują podobne i porównywalne wyniki i to zarówno co do

## Wnioski

Tab. 6. Równoległe wyniki oznaczenia metodą LKF liczby limfocytów i ich procentów wykonane przez trzech pracowników A, B, C

Wyszczególnienie	Liczba limfocytów			Procent limfocytów		
	A	B	C	A	B	C
Pracownik						
Ilość oznaczeń	20	20	20	20	20	20
Wartość średnia	20,46	20,42	21,05	90,19	90,36	90,14
Odchylenie standardowe	2,71	2,39	2,69	1,35	0,93	1,09
Współczynnik zmienności	13,24	11,70	12,80	1,50	1,03	1,04
Test H	$F_{0,05}$	1,29		2,09		
	$F_{0,01}$	2,95		2,95		

1. Przy pomocy metody LKF można wykonać oznaczenia liczby limfocytów i ich procent uzyskując wyniki, których wartości nie wykazują istotnych różnic w porównaniu z wartościami określonymi metodą klasyczną.

2. Wyniki uzyskane przy pomocy metody LKF wykazują mniejszy rozrzut a zatem obciążone są mniejszym błędem niż analogiczne wartości oznaczone metodą klasyczną.

3. Metoda LKF jest wielokrotnie szybsza od metody klasycznej i wymaga mniejszego nakładu pracy personelu laboratoryjnego.

4. Diagnostyczna ocena zwierząt badanych w kierunku białaczki wykazuje zasadniczą zgodność przy badaniach metodą LKF i metodą klasyczną.

5. Wyniki badań uzyskane przy pomocy omawianej metody przez różnych pracowników nie wykazują istotnych różnic.

6. Obraz kontrastowo-fazowy pozwala na jakościową ocenę limfocytów uwidaczniając w

nich niektóre cechy strukturalne nie dające się stwierdzić w barwionym rozmazie krwi.

7. Biorąc pod uwagę stwierdzenia podane w poprzednich punktach należy uznać, że metoda LKF wykazuje przydatność do masowych badań hematologicznych w kierunku białaczki i zasługuje na rozpowszechnienie.

#### Piśmiennictwo

1. Bendixen H. J.: Dt. tierärztl. Wschr. 67, 57, 1960.
2. Chevrier L.: Recl. Méd. vét. 151, 145, 1975.
3. Grundboeck M.: Medycyna Wet. 23, 116, 1967.
4. Grundboeck M.: Medycyna Wet. 34, 11, 1978.
5. Kupsch H. R., Mieth K., Schlüter H., Schielke J. H.: Mh. Vet.-Med. 26, 217, 1971.
6. Rademacher R., Kraus J.: Vet. Med. Praga 12, 679, 1967.
7. Tolle A.: Zentbl. Vet. Med. 12, 281, 1965.
8. Tułczyński M.: Metody laboratoryjne diagnostyki klinicznej. PZWL, Warszawa 1962, s. 619.
9. Instrukcja Nr 1 Ministerstwa Rolnictwa z dnia 2 stycznia 1973 r. w sprawie postępowania przy białaczce bydła.
10. Instrukcja Nr 47 Ministerstwa Rolnictwa — Departamentu Wet. z dnia 15 maja 1978 r. dot. hematologicznego rozpoznawania białaczki bydła.

Adres autora: mgr Hipolit Machoy, ul. Ogrodowa 16, 64-100 Leszno.

Махой Г., Грундбек М. — **Непосредственное определение числа лимфоцитов с применением микроскопа с фазовым контрастом в диагностике лейкоза крупного рогатого скота.**

Описан простой метод, позволяющий при помощи микроскопа с фазовым контрастом непосредственно подсчитывать число лимфоцитов и посредственно определять процент этих клеток. Величины, полученные этим методом, сравнили с величинами, полученными классическим методом. Нашли, что величины, полученные обоими методами, не показы-

вают существенных различий, однако разброс результатов меньше в методе с фазовым контрастом. Новый метод значительно быстрее и требует от лабораторного персонала меньших трудовых затрат. Оба метода позволяют гематологически распознавать лейкоз крупного рогатого скота с подобной точностью. Микроскопическая картина с применением фазового контраста позволяет исследовать морфологию лейкоцитов, показывая некоторые детали, не видимые в обыкновенный микроскоп. Благодаря упомянутым достоинствам описанный метод показывает полную пригодность для рутинных гематологических исследований относительно лейкоза.

Machoy H., Grundboeck M. — **Direct estimation of lymphocyte count by means of phase-contrast microscope in the diagnosis of bovine leukosis.**

A simple method has been described, which provides facilities for direct estimation of lymphocyte count and indirect estimation of lymphocyte percent by means of a phase-contrast microscope. The values obtained by this method have been compared with those obtained by the conventional technique and the following conclusions were drawn: The lymphocyte count and lymphocyte percent estimated by both methods do not show significant differences, however, the dispersion of values seems to be smaller in the phase-contrast method. The new technique occurred to be more rapid and it is connected with a lower cost of labor than the conventional cell counting. Bovine leukosis may be diagnosed by means of both methods with similar accuracy. The phase-contrast picture enables laboratory workers to evaluate detailed morphology of leukocytes, demonstrating some features which cannot be observed in the normal microscope. Owing to the above advantages, the phase-contrast technique may be used in routine blood examinations connected with the diagnosis of bovine leukosis.

## FIZJOLOGIA I PATOLOGIA ROZRODU ORAZ SZTUCZNE UNASIENIANIE

ANDRZEJ BIELAŃSKI, ZYGMUNT JODKO

### Wczesna diagnostyka zamieralności zarodkowej i płodowej u świń na podstawie poziomu progesteronu we krwi

Z Zakładu Fizjologii Zwierząt Instytutu Zootechniki w Krakowie

Zjawisko występowania zamieralności zarodkowej i płodowej u zwierząt domowych jest znane od wielu lat (10, 22). Już w 1914 r. Hammond (9) zauważył, że istnieje znaczna różnica pomiędzy liczbą dojrzewających i owulujących pęcherzyków a liczebnością urodzonego miotu.

Zamieralność może dotyczyć całego miotu względnie pewnej liczby rozwijających się zarodków lub płodów. W pierwszym przypadku przejawia się wystąpieniem rui w pewnym okresie po pokryciu, w drugim — rodzeniem małej liczby prosiąt. Ocenia się, że 30—40% zarodków ginie w pierwszych czterech tygodniach ciąży, natomiast straty całego miotu w

tym okresie mają miejsce u 5—10% pokrytych loch (22).

Utrzymanie ciąży u świń uwarunkowane jest przedłużeniem czynności wydzielniczej ciałek żółtych (4). Dlatego zmiany poziomu progesteronu we krwi mogą być jednym z wczesnych wskaźników diagnostycznych zamierania zarodków lub płodów. W praktyce ułatwiać to może selekcję zwierząt nieciąężarnych.

#### Materiał i metody

Do doświadczenia użyto 166 loch należących do fermy przemysłowej opartej na technologii jugosłowiańskiej. Lochy unasieniano dwukrotnie w ciągu rui na-