

Obsah arzenu ve svaích a vnitřních orgánech otráveného skotu

Содержание мышьяка в мышцах и внутренних органах отравленного крупного
рогатого скота

Über Arsengehalt in den Muskeln und inneren Organen bei vergifteten Rindern

Inž. R. SVOBODOVÁ, MVDr. a RNDr. T. MEDEK

Státní vědecký veterinární ústav, Praha, pobočka Brno,
vedoucí MVDr. J. Křivinka

Došlo dne 14. V. 1959

Úvod

Poměrně častý výskyt akutních otrav užitkových zvířat sloučeninami arzenu byl v posledních letech několikrát předmětem studia jeho kvantitativního zjišťování ve svalstvu a vnitřních orgánech. Důvodem bylo především přezkoušení nezávadnosti masa z otrávených a nutně odporažených zvířat pro běžný konzum (1–6).

Ve starší literatuře se všeobecně uvádí, že maso z těchto zvířat je po odstranění vnitřních orgánů způsobilé k požívání (1). Nověji byl tento názor korigován Kováčem (7), který doporučuje v každém případě kvantitativní chemický rozbor a navrhuje vyloučit z konzumu kromě vnitřních orgánů také maso s obsahem arzenu nad 5 mg/1 kg. Toto stanovisko zastává i Mathé (8), která na několika případech experimentálních otrav různými dávkami arzenových sloučenin zjistila, že obsah arzenu v maso otrávených zvířat zřídka přesahuje hodnotu uvedenou Kováčem. Při stanovení tohoto maximálního přípustného obsahu arzenu vychází obě citované práce z úvahy, že při požití 600 g masa za den (což považují autoři za hranici denní spotřeby na osobu), je množství požitého arzenu hluboko pod terapeutickými dávkami, které činí 5–10 mg kysličníku arzenitého, tj. 3,8–7,7 mg arzenu *pro die* pro dospělého člověka (9). Mathé uvádí dále v souhlase s nálezy Hama, Klineho a Ensmingera (10), že obsah arzenu ve svaích rychle klesá, a podaří-li se otrávené zvíře udržet na živu (např. vhodnou terapií) po několik dní, klesne až na zlomky mg/1 kg.

V souvislosti s možností požívání masa byla v několika pracích diskutována i otázka distribuce arzenu v těle otrávených zvířat. S výjimkou práce Mathéové (8), která uvádí hodnoty nalezené při rozboru různých svalů, jater, ledvin, sleziny, srdce, bránice a srsti u skotu, ovcí a drůbeže, jsou údaje v ostatních nám

dostupných pracích velmi neurčitě, i když se vesměs shodují v tom, že nejvyšší obsah arzenu byl nalezen v játrech (řádově až 100 mg/1 kg), ledvinách, slezině a žaludku (11). Z našich autorů uvádí Oplištil (12) několik případů kvantitativního zjišťování obsahu arzenu ve svalech u skotu a prasat, přičemž u skotu nalezl 1,2–1,7 mg/1 kg.

V průběhu několika let jsme měli možnost na řadě případů nahodilých otrav hospodářských zvířat pozorovat, že obsah arzenu ve svalech neklesá tou měrou, jak uvádí Mathé, neboť i u zvířat, která se udržela na živu po více dní, jsme nacházeli několik mg množství v 1 kg svaloviny. Naše pozorování jsme měli možnost ověřit v poslední době na materiálu ze 60 kusů skotu, který jsme obdrželi k toxikologickému vyšetření z různých míst. Okolnost, že jsme měli k dispozici větší počet vzorků vnitřních orgánů, dovolila nám porovnat údaje získané při experimentálních otravách, kde byl arzén aplikován *per os* nebo intramuskulárně (8) s hodnotami nalezenými při otravách v terénu.

Šlo vesměs o otravy zvířat blíže neurčeným množstvím arzeničnanu vápenatého, použitého v postižených chovech jako insekticidního prostředku (Aredyn, Aresin). Ve všech případech šlo o alimentární otravu, při které se dostal jed do zažívacího traktu společně s krmivem nebo olizáním srsti poprášené uvedenými insekticidy. Zvířata byly ve všech případech nutně odporažena. Několik málo kusů bylo poraženo záhy po zjištění prvních příznaků otravy, většina však byla odporažena v průběhu 1–10 dnů po předchozím podávání běžných antidot (*carbo animalis*, *magnesia usta*, *natrium thiosulfuricum* apod.).

K toxikologickému vyšetření jsme obdrželi obsahy předžaludků, slezu, střev, svaly z předních a zadních končetin. V některých případech kromě toho také části jater, ledviny, sleziny, srdce, žluče a krve.

V obsahu zažívacího traktu byl prokazován arzén pouze kvalitativně metodou Reinschovou (13) a Gutzeitovou. Ve svalech a ostatních orgánech bylo však provedeno kvantitativní stanovení pomocí kolorimetrické metody Vašák-Šedivcovy (14), založené na vzniku intenzivně červeného zabarvení, které poskytuje arzenovodík s dietylkarbaminanem stříbrným v pyridinovém prostředí.

Přehled nalezených hodnot a některé obecné závěry, z nich plynoucí, jsou předmětem této práce.

Pokusná část a výsledky

Chemikálie

Veškeré použité chemikálie byly jakosti p. a., přičemž kyselina sírová, chlorovodíková, dusičná a granulovaný zinek byly prosté arzenu. Potřebné roztoky byly připraveny podle citované práce Vašák-Šedivcovy.

Přístroje

Pro fotokolorimetrická měření byl použit Pulfrichův fotokolorimetr s filtrem S 550 a kyvety o síle 1 cm. U původního přístroje na vyvíjení a absorpci arzenovodíku podle Vašák-Šedivce byla odstraněna připouštěcí nálevka. Zabránilo se tak ztrátám na arzenovodíku.

Při všech kvantitativních analýzách bylo použito metody výše uvedených autorů. Její přesnost byla ověřena na vzorcích masa se známým obsahem arzenu

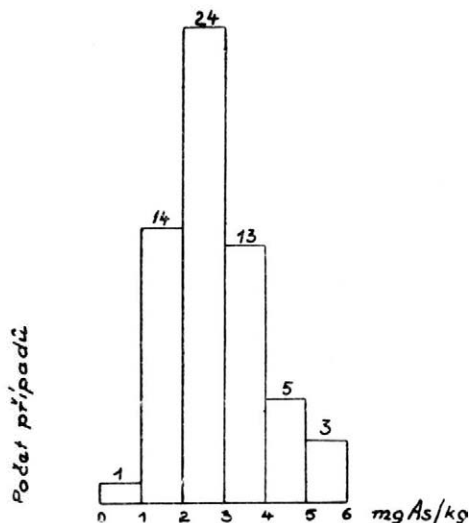
postupem popsaným Oplišilem (12). Nalezené hodnoty byly přepočteny na obsah arzenu v mg/l kg vzorku.

Obsah arzenu ve svalích

Nalezené hodnoty obsahu arzenu ve svalích předních a zadních končetin téhož kusu vykazovaly velmi malé rozdíly až na ojedinělé případy. Proto pro další hodnocení byly brány průměrné hodnoty, případně byl pro analýzu připraven homogenát z obou obdržených vzorků.

Zjištěný obsah arzenu u jednotlivých případů kolísal v mezích 0,68 až 5,77 mg As/l kg svalu, přičemž se u většiny vzorků pohyboval mezi 1,00 až 4,00 mg/l kg (graf 1), při celkovém průměru všech případů 2,78 mg/l kg (tab. I). Pouze u třech případech (tj. 5 %) z celkového počtu 60 vyšetřovaných kusů byl nalezen obsah arzenu vyšší než 5 mg/l kg .

Průměrné hodnoty obsahu arzenu nalezené u kusů poražených ve zhruba stejných časových odstupech od pozření jedu (několik hodin, které jsou v tabulce označeny jako 0 dnů, až do 11 dnů) jsou uvedeny v tabulce II.



Graf 1: Obsah arzenu ve svalích

Obsah arzenu v játrech

Nalezené hodnoty arzenu v játrech se shodovaly s údaji uváděnými v literatuře a byly téměř čtyřikrát vyšší než ve svalích. Celkový průměr nálezů z obdržených 38 vzorků činil 9,29 mg As/l kg , při mezích hodnotách 2,50 mg/l kg až 22,10 mg/l kg (tab. I). Sestupná tendence průměrů po jednotlivých dnech od pozření jedu je zřejmá z tabulky II.

Obsah arzenu v ledvinách

Vzorky ledvin jsme obdrželi pouze v některých případech, takže z celkového počtu vyšetřovaných otrav podařilo se zachytit pouze 24 hodnoty. I na tomto omezeném počtu je však zřejmé, že obsah arzenu v ledvinách je průměrně o něco vyšší než v játrech. Průměrná hodnota v ledvinách byla 10,26 mg As/l kg při rozmezí 3,45–29,00 mg As/l kg . Hodnoty po jednotlivých dnech ukazují značnejší výkyvy. Zásadně klesající tendence je však patrna i zde (tab. I a II).

Obsah arzenu ve slezině

Slezina byla vyšetřována celkem v 27 případech. Průměrný obsah arzenu je zde obzvláště vysoký na rozdíl od pozorování dříve popsaných (8,11) a činí 16,16 mg As/l kg . Jednotlivé nálezy pohybují se v rozmezí 3,95–33,00 mg/l kg (tab. I). Ve srovnání hodnot nalezených po určitých časových úsecích v průběhu otravy jeví se však značná nepravidelnost (tab. II).

Obsah arzénu v srdci a žluči

Vzorky těchto orgánů získali jsme k vyšetření pouze ojediněle, takže se podařilo zachytit jen 10, příp. 8 hodnot (tab. I). Obsah arzénu v srdci kolísá u těchto případů v mezích 0,68–2,30 mg/1 kg, při celkovém průměru 1,41 mg/1 kg.

Ve žluči nebyl ani v jednom případě zjištěn obsah vyšší než 0,5 mg As/1 kg.

I.

Orgány	Svaly	Játra	Ledvina	Slezina	Srdce	Žluč	Krev
Průměrná hodnota	2,78	9,29	10,26	16,16	1,41	0,5	0,84
Maximální hodnota	5,77	22,10	29,00	33,00	2,30	—	1,53
Minimální hodnota	0,68	2,50	3,45	3,95	0,68	—	0,53
Celkový poč. vz.	60	38	24	27	10	8	7

II. Průměrné hodnoty obsahu arzénu v obdobích od 0 do 11 dnů po zjištění prvních příznaků otravy

Doba	Svaly	Játra	Ledvina	Slezina	Srdce
0	3,31	22,10	29,00	27,00	—
1	2,88	12,24	12,13	12,48	—
2	3,00	13,20	15,20	7,60	—
3	3,45	9,46	10,80	3,95	—
4	3,15	9,23	—	13,60	—
5	3,02	10,05	12,50	28,00	2,11
6	2,05	5,80	12,00	12,80	—
8	2,41	—	—	—	—
9	2,21	—	—	—	—
10	1,96	6,75	7,11	17,53	1,33
11	1,78	5,05	5,13	33,00	—

V tabulce č. III jsou uvedeny průměrné hodnoty obsahu arzénu ve svaích, v játrech, v ledvinách a ve slezině u těch případů, kdy byly analyzovány všechny tyto orgány u téhož kusu. Nebyly zde na rozdíl od tabulky I započteny hodnoty nalezené u kusů, kde byly provedeny analýzy pouze v některých z těchto částí.

Tabulka III.

Orgány	Svaly	Játra	Ledvina	Slezina
Průměrná hodnota	2,53	9,31	10,26	16,48
F	1	3,7	4,1	6,5

F-faktor udávající poměrné množství arzénu v jednotlivých orgánech vztažené na hodnotu ve svaích vyjádřenou 1.

Všechny hodnoty uvedené v tabulkách udávají množství arzénu v mg/1 kg.

V 7 případech byla vyšetřována krev odebraná v období 6–9 dnů po objevení se prvních příznaků otravy. Zjištěná množství arzenu pohybovala se v rozmezí od 0,53–1,53 mg/l kg při průměrné hodnotě 0,84 mg/l kg.

Diskuse

Hodnoty obsahu arzenu ve svalectech a některých vnitřních orgánech skotu, uvedené ve statistickém přehledu v pokusné části této práce, ukazují na některé zásadní rozdíly mezi naším pozorováním a dřívějšími nálezy, založenými na analýze materiálu získaného při experimentálně vyvolaných otravách. Je to především otázka obsahu arzenu ve svalectech, kde byl pozorován různými autory již po několika hodinách — případně dnech — po vyvolání otravy pokles téměř na nulovou hodnotu.

Hodnoty námi nalezené však ukazují, že tento poznatek není možno bez dalšího aplikovat na náhodné akutní otravy v terénu, kde se kromě proměnlivého množství pozřeného jedu uplatňuje řada dalších faktorů, které vylučování jedu z organismu podstatně ovlivňují. Zatímco při experimentálních otravách, jak jsou popisovány dříve citovanými autory (8, 9), bylo použito po několik dní vždy jen menších dávek arzenu (např. 0,35 mg As_2O_3), jde při otravách v terénu většinou o jednorázové přijetí většího množství jedu. Jed zůstává pak po více dní deponován v zažívacím traktu, hlavně v systovaných předžaludcích, odkud je zvolna vstřebáván především sliznicí slezu. Zde je zvláště vhodné prostředí k resorpci arzenu z jeho nerozpustných sloučenin, které následkem silně kyselého prostředí přecházejí na dobře rozpustnou a tím snadno resorbovatelnou formu. Resorpce arzenu ve střevech se uplatňuje hlavně v době bezprostředně po pozření jedu; později jeho obsah rychle poklesne zvýšenou sekrecí podrážděné sliznice a vylučováním prudkými průjmy. Naproti tomu se dá předpokládat resorpce jedu také v předžaludcích, hlavně v batoru, kde po několika dnech působení jedu dochází pod zrohovatelným epitelem k silnému dráždění, případně až poleptání stěny, která se poté stává pro jed dobře prostupnou.*)

Souhrnně lze říci, že u otrav v terénu je pravděpodobně vylučování jedu z organismu kompenzováno stálým vstřebáváním dalších dávek jedu zadržného v předžaludcích, čímž se jeho hodnoty (např. ve svalectech) udržují i po několik dnů na poměrně vyšší hladině. Tomu odpovídají i námi nalezené průměrné hodnoty uvedené v tab. II, které ukazují na velmi malé rozdíly v nálezech u kusů poražených v jednotlivých dnech, i když v průměru sledovaných 11 dnů je mírně klesající tendence zřejmá.

Lepší shody s údaji literatury bylo dosaženo v otázce celkového obsahu arzenu v mase poražených zvířat. Z grafu 1 je patrné, že u 95 % z celkového počtu analyzovaných případů byl obsah arzenu nižší než 5 mg/l kg, přičemž obsah u převážné většiny vzorků nepřekročil ani hodnotu 4 mg/l kg. Přijmeme-li tedy názor Kováčův, že takové maso může být považováno za zdravotně nezá-

*) Patologicko-anatomické změny vnitřních orgánů pozorované při otravách arzenem v terénu budou podrobně popsány v samostatné práci.

vadné, lze říci, že při otravách skotu v terénu je maso z převážné části požitelné. Obsah arzenu však musí být bezpodmínečně kontrolován chemickým vyšetřením, neboť event. vyšší obsah, jak je ostatně zřejmé z dříve uvedeného, nemůže být vyloučen.

V souhlase s jinými autory je i námi nalezený vyšší obsah arzenu v játrech (viz tab. I), i když nebyly zaznamenány hodnoty tak vysoké, jak jsou někdy udávány (srv. 11) Tento poměrně vysoký obsah jedu v játrech tkví v jejich detoxikační funkci, která se uplatňuje hlavně v první době po vyvolání otravy. S postupujícími degenerativními změnami jaterních buněk (parenchymatózní a tuková degenerace) slábne i jejich detoxikační schopnost a resorbovaným jedem jsou více zatěžkávány jiné orgány.

S detoxikační funkcí souvisí i vyšší nálezy arzenu v ledvinách, které svou exkretční činností doplňují detoxikační činnost jater. Skutečnost, že u případů námi vyšetřovaných jsou hodnoty arzenu o něco vyšší než bylo dosud uváděno, se dá vysvětlit právě tou okolností, že detoxikační kapacita jater je při resorpci masivních dávek jedu — jak je tomu zřejmě u většiny otrav v terénu — brzy překonána.

Zajímavý je však zvláště obsah arzenu ve slezině, který u případů námi vyšetřovaných byl nejvyšší ze všech orgánů (viz tab. I—III). I když je známo, že slezina je orgánem s bohatým retikuloendoteliálním systémem, který dovede zachycovat železo z odbouraných krvinek a jiných buněk, jsou vysoké nálezy arzenu překvapující. Ukazují na to, že slezina dovede zachycovat pravděpodobně i jiné těžké kovy a upozorňují na její zvláštní roli. Podobná pozorování nebyla dosud popsána a zasluhovala by podrobnějšího prostudování, již vzhledem k obecně ne dosti jasné funkci tohoto orgánu v živočišném těle.

Celkový obraz otravy z hlediska nalezených hodnot obsahu arzenu v různých orgánech u téhož kusu, jeví jisté difference, způsobené individuálními poměry u jednotlivých kusů, do značné míry proměnlivými. Počítáme-li však s určitou kompenzací těchto proměnlivých vlivů při posuzování většího počtu případů, jak je tomu u průměrů uvedených v tab. III, dojdeme alespoň aproximativně k poměrům odpovídajícím stavu u jednoho kusu. Z horizontálního srovnání těchto hodnot je potom zřejmé, že zatímco obsah arzenu u jater a ledviny činí 3,7, resp. 4,1 násobek hodnoty uvedené ve svalch, je tento poměr vyjádřen u sleziny faktorem 6,5.

Z uvedených nálezů popsaných v pokusné části, i některých diskutovaných závěrů vyplývá, že zatímco otázka požitelnosti masa zvířat otrávených arzenem může být považována za vyjasněnou, vyvstávají u otrav většími dávkami jedu další problémy. I když nebude mít jejich vysvětlení z hlediska konzumu okamžitý praktický význam, bude velmi důležité pro možnost bližšího poznání funkce a vzájemného vztahu jednotlivých orgánů. Tyto problémy však mohou být řešeny pouze na základě rozsáhlejších experimentálních podkladů, získaných za poměrů blízkých náhodným otravám v terénu.

Souhrn

1. U 60 případů náhodných otrav skotu arzeničnanem vápenatým byly provedeny analýzy svalů, jater, ledvin, slezin, srdce, žluči a krve.

2. V jednotlivých orgánech byly zjištěny tyto hodnoty obsahu arzenu v mg/l kg:

Orgány	Průměrná hodnota	Minimální hodnota	Maximální hodnota
Svaly	2,78	0,68	5,77
Játra	9,29	2,50	22,10
Ledvina	10,26	3,45	29,00
Slezina	16,16	3,95	33,00
Srdce	1,41	0,68	2,30
Žluč	<0,5		
Krev	0,84	0,53	1,53

3. Bylo zjištěno, že pouze u 5 % všech analyzovaných případů otrávených zvířat přesahuje obsah arzenu v mase hodnotu 5 mg/l kg. V souhlase s dřívějšími literárními údaji připouští autoři možnost konzumování masa ze zvířat otrávených arsenem. Doporučují však v každém případě provedení kvantitativního chemického vyšetření.

4. Bylo prokázáno, že obsah arzenu ve svalectech klesá u náhodných otrav v terénu velmi zvolna, na rozdíl od dříve popisovaných experimentálních otrav. Tento zjev je vysvětlován dlouhou trvající resorpcí jedu deponovaného v zažívacích orgánech.

5. Poukázáno na relativně vysoké hodnoty arzenu v játrech, ledvině a zvláště slezině a proveden pokus o částečné vysvětlení nálezů na základě funkčních vztahů jednotlivých orgánů.

Literatura

1. Fröhner - Völker: Lehrbuch der Toxikologie für Tierärzte, 1950. — 2. Bohosiewicz, M.: Zeszyty Naukowe WSR, Wrocław, 3, 1955. — 3. Bohosiewicz, M.: Zeszyty Naukowe WSR, Wrocław, 2, 1956. — 4. Baženov, S. V.: Veterinarnaja toksikologija, 1951. — 5. Jelínek, V. a kolektiv: Soudní veterinární medicína, 1958. — 6. Vuillaume, R.: Off. int. dés. epizootolog. XLVI, Mai 1956, 258-272. — 7. Kovács, J.: Mag. Állat. Lapja, 5; 277, 1949. — 8. Máthé, J.: Mag. Állat. Lapja, 7; 305, 1952. — 9. Hauschild, F.: Pharmakologie und Grundlagen der Toxikologie, 1956. — 10. Ham, Kline, Ensminger: Am. J. of Vet. Res. 10; 150, 1949. — 11. Vuillaume, R.: Rec. Med. Vet., 127; 709, 1951. — 12. Oplištil, M.: Sborník VŠZL v Brně, 5; 305, 1957. — 13. Přibyl, E.: Biologické spisy Vysoké školy zvěrolékařské, Brno, sv. V., 2, 1926. — 14. Vašák, V., Šedivec: Chem. listy, 46, 341, 1952.

Содержание мышьяка в мышцах и внутренних органах отравленного крупного рогатого скота

1. В 60 случаях случайного отравления крупного рогатого скота мышьяковистокислым кальцием были приведены анализы мышц, печени, почек, селезенки, сердца, желчи и крови.

2. В отдельных органах было обнаружено следующее содержание мышьяка в мг/1 кг:

Органы:	Среднее количество	Минималь. количество	Максималь. количество
Мышцы	2,78	0,68	5,77
Печень	9,29	2,50	22,10
Почки	10,26	3,45	29,00
Селезенка	16,16	3,95	33,00
Сердце	1,14	0,68	2,30
Желчь	0,50		
Кровь	0,84	0,53	1,53

3. Было установлено, что только у 5 % всех разбираемых случаев отравления животных содержание мышьяка в мясе превышает количество 5 мг/1 кг. В соответствии с мнением прежних исследователей авторы статьи допускают возможность употребления в пищу мяса отравленных мышьяком животных. Рекомендуется все же в каждом отдельном случае провести количественный химический разбор.

4. Было доказано, что содержание мышьяка в мышцах падает при случайных отравлениях на пастбище крайне медленно в отличие от раньше описанных экспериментальных отравлений. Это явление объясняется длительной ресорбцией яда находящегося в пищеварительных органах.

5. Авторы отметили относительно высокое содержание мышьяка в печени, почках и особенно в селезенке и пытались частично объяснить это явление на основании функциональных взаимоотношений отдельных органов. В почках и особенно в селезенке и осуществили опыт частично объяснить это явление на основании функциональных взаимоотношений отдельных органов.

Über Arsengehalt in den Muskeln und inneren Organen bei vergifteten Rindern

1. In 60 Fällen von zufällig durch Kalziumarsenat vergifteten Tieren wurden Analysen der Muskeln, Leber, Nieren, Milz, Herz, Galle und Blut durchgeführt.

2. In den einzelnen Organen wurden folgende Werte von Arsengehalt in mg/1 kg festgestellt:

Organe	Durchschnittswert	Minimalwert	Maximalwert
Muskeln	2,78	0,68	5,77
Leber	9,29	2,50	22,10
Niere	10,26	3,45	29,00
Milz	16,16	3,95	33,00
Herz	1,41	0,68	2,30
Galle	< 0,50	—	—
Blut	0,84	0,53	1,53

3. Es wurde festgestellt, daß nur in 5 % der analysierten Fälle von vergifteten Tieren der Arsengehalt im Fleisch den Wert 5 mg/1 kg übersteigt. In Übereinstimmung mit früheren Literaturangaben finden die Autoren die Möglichkeit des Konsums vom Fleisch der durch Arsen vergifteten Tieren, als zulässig. Sie empfehlen aber in jedem Falle die Durchführung einer quantitativen chemischen Untersuchung.

4. Es wurde festgestellt, daß der Arsengehalt in den Muskeln bei Zufallsvergiftungen im Terrain sehr langsam sinkt, zum Unterschied zu den bisher beschriebenen Experimentalvergiftungen. Diese Erscheinung wird durch die langdauernde Resorption des in den Verdauungsorganen deponierten Giftes erklärt.

5. Es wird auf die hohen Arsenwerte in Leber, Niere und besonders in der Milz hingewiesen und ein Versuch unternommen, die Befunde teilweise auf Grund der Funktionsbeziehungen zwischen einzelnen Organen zu erklären.

Toxoplazmóza psa - výsledky studia serologické diagnostiky vazbou komplementu

(I. část)

Токсоплазмоз собаки — результаты изучения серологической диагностики
путем связывания комплемента

(I часть)

Toxoplasmose beim Hund — Ergebnisse eines Studiums serologischer Diagnostik mittels
Komplementenbindung

(I. Teil)

MVDr. M. POTOCEK

Veterinární výzkumné středisko, Praha

Došlo dne 25. IX. 1958

Úvod

Toxoplazmóza je závažný, dosud nedořešený problém jak v medicíně humánní, tak i veterinární, který v současné době zajímá mnoho badatelů. O aktuálnosti problému svědčí stále rostoucí počet publikací. Na I. sjezdu československých parazitologů, který se konal v Praze ve dnech 6.—9. října 1957, byla otázce toxoplazmózy rovněž věnována značná pozornost.

Z četných literárních údajů vysvítá, že pes hraje významnou úlohu v epidemiologii toxoplazmózy. Z hlediska humánní toxoplazmózy je mnoha autory pes uváděn jako nejdůležitější zdroj infekce (20). Vyřešení diagnostiky toxoplazmózy u psa je velmi důležité také proto, že klinický průběh toxoplazmózy psa je v mnohém shodný s jinými nemocemi psa nepřenosnými na člověka. Nesprávná diagnóza může způsobit nevědomé ohrožení zdraví lidí, přicházejících do styku s nemocným zvířetem.

Přímý mikroskopický průkaz parazita je poměrně nesnadný. Paraziti se nalézou ponejvíce v akutním stadiu infekce. Při subakutní, chronické a asymptomatické formě je nález *Toxoplasma gondii* jen náhodný. Histologicky mohou být sice paraziti prokázáni v různých orgánech a tkáních, tento průkaz je však zpravidla značně pracný (22).

Rovněž další metoda průkazu parazita, pokus na zvířeti, nevede vždy k úspěchu. Westphal a Palm nepovažují přímý průkaz parazita u pokusného zvířete za bezpodmínečně nutný k diagnóze toxoplazmózy, neboť i při pokusu na velmi vnímavém zvířeti bylo někdy možno infekci prokázat jen sérologicky Sabin-Feldmannovým testem a vazbou komplementu (11).

Proto má při epidemiologickém průzkumu toxoplazmózy sérologické vyšetření velký význam. Sérologická diagnostika je prováděna nejčastěji vazbou kom-

plementu (RVK) a Sabin-Feldmannovým testem (SFT). Podstatou reakcí jsou sice rozdílné imunologické mechanismy, výsledky však bývají značně shodné.

SFT je metoda poměrně složitá, vyžaduje značných zkušeností, při provádění jsou určité metodické těžkosti a pro rutinní vyšetřování je málo vhodná. Proto se v poslední době častěji používá RVK, neboť je v provedení snadnější a běžná při diagnostice některých infekčních chorob.

SFT i RVK jsou pro toxoplazmózu specifické, názory na hodnocení hranice pozitivních titrů se však různí.

Nízké titry (při začátku infekce) lze hodnotit jako pozitivní, jestliže při dalším vyšetření stoupají. Po určitém čase titr začne opět klesat, nastane fáze, kdy i nízký titr musí být opět posuzován jako pozitivní. Je ovšem třeba znát výši titru protilátek, který má diagnostickou cenu. U některých infekcí možno sérum vyhodnotit jako pozitivní již v nejnižším ředění, u jiných infekcí je hranice ředění séra z hlediska diagnostického posunuta výše. Aby bylo možno tuto hranici stanovit, je třeba mimo jiné znát procento průměrné promořenosti u dotyčné infekce. Jestliže je toto procento poměrně vysoké, má negativní výsledek zkoušky velkou praktickou cenu. Naopak zase, je-li nízké, pak jsou pozitivní nálezy velmi cenné a svědčí pro infekci (11). Údaje promořenosti toxoplazmózou jak u lidí, tak i zvířat se velmi různí. U lidí je udávána promořenost 3–50 %, u psů 4–50 %.

Pro kliniku však nestačí jednorázové stanovení pozitivnosti titru. K určení, zda jde o aktivní fázi onemocnění, je třeba znát dynamiku tvorby protilátek, kterou můžeme vyhodnotit po opakovaném sérologickém vyšetření, a to nám teprve umožňuje specifické ocenění sérologického vyšetření.

Značným nedostatkem sérodiagnostiky toxoplazmózy je nejednotnost vyšetřovacích metod. Reakce podléhají různým proměnným vlivům, technika vyšetřování je různá a výsledky jsou různě vyhodnocovány podle toho, od které výše se považuje titr za specificky platný. Je proto třeba jednotného stanovení a sjednocení techniky testů ve všech laboratořích, aby tím byly zjišťovány ve všech částech světa srovnatelné hodnoty.

Vzhledem k těmto skutečnostem jsme se rozhodli propracovat sérologickou diagnostiku toxoplazmózy psů pomocí RVK s předpokladem, že výsledků tohoto studia bude možno použít při diagnostice toxoplazmózy i u jiných druhů zvířat.

Ve své práci Toxoplazmóza psa — příspěvek k sérologické diagnostice (20) jsem uvedl poznatky získané při použití reakce vazby komplementu prováděné ve zkumavkách. Při dalším výzkumu jsme přešli na modifikaci kapkové reakce vazby komplementu. Tato skutečnost, jakož i poznatky při dalším výzkumu, měly za následek, že jsme poněkud změnili jak provádění vlastní reakce, tak i kritéria pro vyhodnocování výsledku reakce. Proto v následujícím podrobněji uvádím metodiku sérologické diagnostiky toxoplazmózy psů kapkovou metodou vazby komplementu tak, jak ji nyní provádíme a která se nám plně osvědčila při rutinním vyšetřování.

Část experimentální

I. Sérologická diagnostika reakcí vazby komplementu

A. Všeobecná pravidla a příprava jednotlivých složek

Do všeobecně platných pravidel pro provádění RVK třeba zařadit na první místo zásady mytí laboratorního skla. Zkumavky, pipety a všechno laboratorní sklo myjeme v čisté, nejlépe tekoucí vodě, bez jakýchkoliv přísad zásad či kyselin a po opláchnutí v destilované vodě sušíme v horkovzdušném sterilizátoru. Treba

si uvědomit, že jakékoliv vychýlení prostředí při RVK na stranu kyselou a zejména na stranu alkalickou, má za následek změny ve výsledku RVK. Ke zředování reagentů používáme fyziologického roztoku přibližně neutrální reakce, neboť RVK probíhá nejlépe při pH 6,8–6,9.

1. Fyziologický roztok

Připravíme si zásobní, základní roztok:

<i>NaCl</i>	170 g
<i>MgSO₄</i>	2 g
4% roztok <i>CaCl₂ · 2H₂O</i>	1 ml
<i>Aqua destilata</i>	1000 ml

Z tohoto základního roztoku pak připravujeme fyziologický roztok pro RVK tak, že na 1 díl základního roztoku přidáme 19 dílů destilované vody. Fyziologický roztok pak přefiltrujeme.

2. Antigen

a) Příprava

Toxoplazmový antigen pro RVK připravujeme z infikovaných chorioalantoidních blan (CHA).

Z infikované myšky je sterilně odebrán peritoneální exsudát, který je zředěn sterilním fyziologickým roztokem (FR) v poměru 1 : 10. Na 1 ml zředěného peritoneálního exsudátu je přidáno 1000 j. penicilinu a 1500 j. streptomycinu. Suspenze se ponechá stát 1 hodinu při +4° C v chladničce, načež jsou jí očkována jedenáctidenní embrya na chorioalantoidní blánu, klasickým způsobem kolabovanou, dávkou 0,4 ml. Infikovaná vejce inkubujeme 4 dny v termostatu při 36° C. Čtvrtý den p. i. jsou vejce otevřena, CHA odebrány a odsáta alantoidní tekutina. Z každé CHA je část odstřižena za účelem kontroly na bakteriální sterilitu. Další embryonální pasáž je prováděna tak, že CHA jsou rozetřeny a přidáním 0,5 ml sérového bujónu (s 5 % koňského séra) na 1 CHA je připravena přibližně 20% suspenze. Na 1 ml suspenze se přidá 1000 j. penicilinu a 1500 j. streptomycinu. Další embryonální pasáž je provedena naočkováním 0,4 ml suspenze na CHA jedenáctidenních kuřecích embryí. Při embryonálních pasážích se zjišťuje infekciozita infikovaných CHA pokusem na myškách, které jsou infikovány i. p. 0,2 suspenze CHA.

Po 2 až 4 embryonálních pasážích dochází již k velmi dobrému růstu toxoplazmat, která vyvolávají masivní edematózní léze na CHA a vytvářejí přesně ohraničené bělošedé fokusy. Fokusy při dalších pasážích, při větším pomnožení toxoplazmat, splývají v bělošedé ostře ohraničené povlaky.

K přípravě antigenu používáme dobře porostlých CHA pouze ze živých embryí. CHA jsou kontrolovány na bakteriální sterilitu, nesterilní jsou z přípravy antigenu vyřazeny.

Odebrané CHA jsou promývány ve sterilním FR tak dlouho, až FR zůstane úplně čistý bez příměsi krve, načež jsou rozdrobeny v turmixu. Po rozdrobení je k nim přidána destilovaná voda v množství 0,5 ml na jednu CHA a poznovu jsou v turmixu ještě dobře rozmělněny, takže získáme dokonale jemnou suspenzi CHA. Tu odsajeme, přesně změříme a přidáme k ní stejné množství FR s 0,6 % fenolu, takže výsledná koncentrace fenolu činí 0,3 %. Suspenze je pak uložena 7 dní při +4° C v chladničce, načež během dalších 7 dnů je zmrazována při –40° C a rozmrazována, a to nejméně desetkrát. Pak je antigen odstředěn 15 minut při 2000 obrátkách. Po odstředění je supernatant odsát a poznovu nejméně pětkrát zmražen a rozmražen a opět odstředěn. Odsátý supernatant je uložen na 3 dny

při -40°C a po rozmražení je odstředován 20 minut při 4000 obrátkách. Takto připravený antigen je ponechán 7 dní v chladničce při $+4^{\circ}\text{C}$ aby zrál. Po sedmi dnech je opět odstředěn 20 minut při 4000 obrátkách, vytitrován, rozplněn do ampulí a uskladněn k použití při $+4^{\circ}\text{C}$. Takto připravený a uchovávaný antigen vydrží i půl roku, aniž by doznal znehodnocení. Hotový antigen však neuskładňujeme ve zmrzlém stavu, neboť při rozmražení by opět došlo k vypadnutí zbytků tkáňových látek, byť již nyní jen v nepatrném množství. Mělo by to za následek, že bychom museli antigen před použitím opět odstředovat a znovu vytitrovat.

b) Titrace antigenu

Připravený antigen musí vyhovovat těmto požadavkům:

1. nesmí být antikomplementární,
2. nesmí mít vlastní hemolytický účín,
3. musí být specifický,
4. musí mít dostatečně velkou reakční šíři,
5. musí být dostatečně citlivý,
6. musí mít dostatečnou hloubku.

Jestliže by antigen nevyhovoval třeba jen v jednom bodu, pak takového antigenu nemůžeme používat. Od tohoto přísného kritéria nesmíme upustit, neboť na kvalitě antigenu závisí správné vyhodnocení séra. Tím zdaleka neříkáme, že ostatním složkám RVK není nutno věnovat stejnou pečlivost.

Všechny vlastnosti antigenu třeba stanovit příslušnými titracemi. Titraci antigenu provádíme s hyperimunním sérem toxoplazmovým, nejméně pěti séry negativními a nejméně jedním sérem cizorodým, např. psinkovým. Séra do reakce používáme v ředění 1 : 10, antigenu pak do příslušného ředění. Titrace antigenu je uvedena v tabulce I.

I. Titrace antigenu

Komplement	4 ‰	5 ‰	6 ‰	7 ‰	8 ‰	9 ‰	4-9 ‰	4-9 ‰	4-9 ‰
Sérum 1 : 10	Hyperimunní Tx						Negativní č. 1-5	Hyp. psinka	FR
Antigen Tx Ředění									
1 : 5	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—	—	—
1 : 10	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—	—	—
1 : 20	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—	—	—
1 : 30	++++	++++	++++	++++	++++	++++	—	—	—
1 : 40	++++	++++	++++	++++	++++	++	—	—	—
1 : 50	++++	++++	++++	++++	++	—	—	—	—
1 : 60	++++	++++	++++	++	—	—	—	—	—
1 : 80	++++	++++	++	—	—	—	—	—	—
1 : 100	++++	++	—	—	—	—	—	—	—
FR	—	—	—	—	—	—	—	—	—

Vysvětlení k tabulce I: 4 ‰ komplement je hodnota 1 MHD, 6 ‰ komplement je 1,5 MHD.

Z tabulky vidíme, že antigen nemá antikomplementární účín, rovněž že nemá vlastní hemolytický účín. Kontrola s FR zajišťuje správnost provedení pokusu, pokud jde o hodnotu jednotky komplementu (1MHD), jakož i nezávadnost použitého FR. Antigen reaguje specificky, jelikož s negativními séry, jakož i cizorodým hyperimunním sérem je reakce negativní, je citlivý, jelikož s hyperimunním sérem

Tx dává pozitivní reakci i ve vysokém ředění, má dostatečně velkou reakční šíři, jelikož se séry negativními i v nejnižším ředění nedává pozitivní reakci a má dostatečně velkou reakční hloubku, neboť v nejnižším ředění váže dostatečný počet jednotek komplementu, více než 2,25 MHD.

Na základě provedené titrace stanovíme nyní antigenní jednotku, tj. nejmenší množství antigenu, které s hyperimunním sérem toxoplazmovým dává ještě pozitivní reakci. V našem případě je to ředění antigenu 1 : 80, jelikož v tomto ředění při hodnocení reakce s 1,5 MHD dává ještě pozitivní reakci. Do vlastní RVK — hlavního pokusu — používáme pak 4—8 jednotek antigenu, v tomto příkladu by to bylo ředění antigenu 1 : 20, neboť si musíme být vědomi toho, že při titraci antigenu s hyperimunním sérem pracujeme s nadbytkem protilátek v séru, kdežto při hlavním pokuse, při němž vyšetřujeme neznámé sérum, pracujeme obvykle s mírným nadbytkem antigenu vzhledem k přítomnosti specifických protilátek a optimálním poměru jednotlivých složek.

3. Hyperimunní sérum toxoplazmové

Hyperimunního séra používáme jako pozitivní kontroly v hlavním pokusu RVK a titrujeme jím, případně identifikujeme jím antigeny.

a) Příprava

K získání hyperimunního séra používáme psů ve stáří 6—12 měsíců. Psi jsou infikováni subkutánně peritoneálním exsudátem myšek, infikovaných kmenem *Toxoplasma Gondii*. Za 1 měsíc po odeznění klinických příznaků je každý pes imunizován ve dvoudenních intervalech pěti stoupajícími dávkami 0,5—3 ml peritoneálního exsudátu myšek s živými toxoplazmami i. v. Po 7 dnech od poslední inokulace je psům odebrána krev a sérum vyšetřeno RVK.

b) Titrace

Hyperimunní sérum je titrováno za účelem zjištění nejvyššího titru proti známému toxoplazmovému antigenu. Příklad vyhodnocení hyperimunního séra toxoplazmového je uveden v tabulce II.

II. Titrace hyperimunního toxoplazmového séra

Komplement v ‰	4 ‰	5 ‰	6 ‰	7 ‰	8 ‰	9 ‰
Antigen (4 jednotky)	Tx 1 : 20					
Hyp. im. sérum Tx —						
ředění 1 : 100	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1 : 200	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1 : 400	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1 : 800	++++	++++	++++	++++	++++	++++
1 : 1600	++++	++++	++++	++	+	—
1 : 3200	++++	++	++	—	—	—

Vysvětlení k tabulce II:

Kontroly nutno zastavit jako při hlavním pokuse RVK — v tabulce nejsou uvedeny.

Komplement — 1 MHD = 4 ‰ komplement.

Titř hyperimunního séra je 1 : 1600, jelikož v tomto ředění, při hodnocení s 1,5 j. komplementu — tj. 6 ‰ komplement — sérum ještě způsobuje zábranu hemolýzy nad 50 ‰, reakce + + +, kdežto v ředění 1 : 3200 je již zábrana hemolýzy pod 50 ‰, reakce na + +, tj. více než 50 ‰ krvinek je hemolyzováno.

Komplement	1 %	1,5 %	2 %	2,5 %
Antigen 1 : 20 + FR FR + FR	+++ +++	++ ++	+ +	+ - ±

4. Komplement

Pokud jde o získání a zpracování komplementu, odkazují na svou práci: Toxoplazmóza psa — příspěvek k sérologické diagnostice (20). Jelikož morčata mohou překonat také latentní toxoplazmózou, je třeba morčecí sérum, používané jako komplement, vždy vyšetřit, zda neobsahuje toxoplazmové komplementfixační protilátky.

Před pokusem provedeme titraci komplementu za účelem zjištění 1 jednotky komplementu (1 MHD), které je to nejmenší množství komplementu, jež způsobí úplnou hemolýzu určitého množství senzibilizovaných beraních krvinek. Příklad titrace komplementu uvádím v tabulce III.

V tomto příkladu je 1 MHD kapka 3% komplementu. Do hlavního pokusu pak bereme 6 ředění komplementu, počínaje 3% komplementem, ve stoupajících dávkách po 0,25 MHD, čili v tomto případě v hlavním pokuse používáme komplementů: 3 %, 3,75 %, 4,5 %, 5,25 %, 6 %, 6,75 %. Vlastní reakci v hlavním pokusu hodnotíme při 1,5 MHD, tj. 4,5 % komplement.

Použití rozvedené řady komplementu, s odstupňováním po 0,25 MHD nám umožňuje v hlavním pokuse RVK:

1. přesnou kontrolu 1 MHD a v důsledku toho i správné odečtení výsledku reakce při 1,5 MHD,

2. vyhodnotit i séra s případným mírným antikomplementárním účinkem, což nám umožňují vyšší dávky komplementu. Přitom však nutno postupovat velmi opatrně a u sér, s větším antikomplementárním účinkem, vyšetření vždy opakovat s novým vzorkem séra.

5. Amboceptor - hemolyzin (králičí) proti beraním krevinkám

Používáme amboceptoru s titrem hemolyzinu nejméně 1 : 4000 a co nejmenším titrem aglutinačním. Pokud nejsme odkázáni na komerční amboceptor a připravujeme si ho sami, snažíme se dosáhnout titru 1 : 10.000. Pro vlastní reakci použijeme, k senzibilizaci beraních krvinek, deseti hemolytických jednotek, tj. např. při titru 1 : 10.000 používáme amboceptoru v ředění 1 : 1000. Touto hypersenzibilizací krvinek vyrovnáváme individuálně různé množství nativního heterohemolyzinu proti beraním krevinkám, přítomného v psích sérech. Tento nativní heterohemolyzin by např. při dvojnásobné senzibilizaci krvinek amboceptorem mohl být příčinou nespecificky negativních výsledků, neboť je známo, že komplement a amboceptor se mohou do jisté míry zastupovat (6). Čím více je přítomno amboceptoru, tím menší je spotřeba komplementu a naopak.

6. Beraní krevinky

Odběr beraní krve provádíme do sterilní transfúzní láhve, ve které je Alseverův roztok tak, že odebereme stejné množství krve jako je Alseverova roztoku a uchovááme ji v chladničce při +4° C. Pro RVK používáme vždy čerstvě odstředěných a propraných krvinek. Krevinky stačí třikrát proprat ve fyziologickém roztoku.

komplementu

	3 %	3,5 %	4 %	4,5 %	5 %	6 %	10 %	Ø
	—	—	—	—	—	—	—	++++
	—	—	—	—	—	—	—	++++

Alseverův roztok připravujeme následovně:

<i>Glukóza</i>	20,5 g	<i>Acid. citrici</i>	0,55 g
<i>NaCl</i>	4,2 g	<i>Aqua destil.</i>	1000,0 ml
<i>Natrium citr. tribas</i>	8,0 g	<i>Merthiolat 1 : 100</i>	10,0 ml

7. Hemolytický systém (HS)

HS připravujeme smícháním stejného množství 4% suspenze beraních krvinek s amboceptorem v příslušném ředění. Před použitím HS do reakce nutno zkontrolovat, zda beraní krvinky po smíchání s amboceptorem mají správnou denzitu, a to takovou, aby reakce na + + + +, při hodnocení podle průhlednosti, byla dobře a jednoznačně hodnotitelná. Není-li tomu tak, musíme HS upravit přidáním beraních krvinek. Správnou denzitu krvinek musíme pochopitelně určit již před nastavením předpokusů a samozřejmě, že tohoto HS používáme pak při všech předběžných titracích, jakož i při hlavním pokusu. Jelikož HS přidáváme do hlavního pokusu až druhý den, za 16–18 hodin, uchováváme HS do druhého dne v chladničce při +4° C.

8. Vyšetřované sérum

Vyšetřované sérum inaktivujeme 30 minut při 56° C. Nemůžeme-li sérum ihned vyšetřit, uložíme je při –40° C až do vyšetření. Před vyšetřením sérum opět zahřejeme 30 minut při 56° C. Touto dvojí inaktivací séra dochází k větší stabilizaci séra, takže případný malý antikomplementární účín, u psích sér dosti častý, je snížen na minimum.

Uchováváme-li sérum k opětnému vyšetření, za účelem srovnání titru protilátek při opakovaném vyšetření pacienta za 7–14 dnů, případně v době rekonvalescence, sérum před vyšetřením opět zahříváme 30 minut při 56° C.

B. Provedení hlavního pokusu

1. Metodika kapkové reakce vazby komplementu

Metoda kapkové reakce vazby komplementu byla popsána v ČSAZV Vet. medicína, r. 1957, č. 5 a proto se zde nebudu zabývat jejím podrobným popisem. Uvádím jen vyhodnocení RVK.

První hodnocení výsledku RVK po 1 hodině provádíme posouzením hemolýzy podle průhlednosti takto:

- + + + + — úplná zábrana hemolýzy, šrafování není viditelné,
- + + + — zábrana hemolýzy nad 50 %, obě černé čáry splývají v jednu, která je jen nezřetelně viditelná,
- + + — zábrana hemolýzy 25–50 %, černé čáry jsou jednotlivě viditelné, avšak nejsou úplně zřetelné,
- + — zábrana hemolýzy pod 25 %, černé šrafování je dobře viditelné, avšak tekutina není čirá.

Druhé odečtení výsledku RVK po 2 hodinách provádíme posouzením proběhlé hemolýzy podle velikosti sedimentu beraních krvinek a podle zbarvení tekutiny v důsledku proběhlé hemolýzy takto:

- ++++ — úplná zábrana hemolýzy, krvinky tvoří velký homogenní sediment, nad nímž je tekutina při průhledu bezbarvá,
- +++ — zábrana hemolýzy nad 50 %, velikost sedimentu krvinek je úměrně zmenšena podle procenta hemolyzovaných krvinek, jejich sediment je však ještě homogenní, tekutina je však již zbarvena od mírně žltorůžového do růžově červeného zbarvení, podle množství uvolněného hemoglobinu,
- ++ — zábrana hemolýzy 25–50 %, sediment erytrocytů je již znatelně menší, není homogenní, okraj sedimentu je většinou sytější, střed pak tvoří slabší prosvítající vrstva erytrocytů, tekutina nad sedimentem je již jasně červeně zbarvena,
- +
- malý nehomogenní sediment, tekutina je lakově červeně zbarvena.

Provedení hlavního pokusu uvádím v tabulce IV, která zahrnuje reakce vyšetřených 8 sér, na nichž jsou znázorněny různé výsledky z hlediska hodnocení pozitivnosti séra.

IV. Provedení

	Komplement	A	B	C	D
		4 %	5 %	6 %	7 %
	Antigen	Tx 1 : 20			
1	Sérum č. 1 1 : 10	++++	++++	++++	++++
2	1 : 20	++++	++++	++++	++++
3	č. 2 1 : 10	++++	++++	++++	++++
4	1 : 20	++++	++++	++++	++++
5	č. 3 1 : 10	++++	++++	++++	++++
6	1 : 20	++++	++++	++++	+
7	č. 4 1 : 10	++++	++++	++++	++
8	1 : 20	++++	++++	++++	—
9	č. 5 1 : 10	++++	++++	++++	+
10	1 : 20	++++	++	+	—
11	č. 6 1 : 10	++	+	—	—
12	1 : 20	++	—	—	—
13	č. 7 1 : 10	++++	++++	++++	++
14	1 : 20	++++	++++	++++	—
15	č. 8 1 : 10	++++	++++	++++	++++
16	1 : 20	++++	++++	++++	++++
17	Sérum posit. Tx 1 : 10	++++	++++	++++	++++
18	Sérum negat. 1 : 10	—	—	—	—
19	FR	—	—	—	—
20	HS + FR bez komplementu	++++	++++	++++	++++

Vysvětlení k tabulce:

Výsledek hodnotíme zásadně při 1,5 MHD = 6 % komplement, 1 MHD = 4 % komplement,

Antigen ředění: 1:20 = 4 jednotky antigenu.

Vyhodnocení vyšetřovaných sér:

- č. 1 silně pozitivní — sérum v ředění 1 : 20 váže více než 2,25 MHD,
- č. 2 pozitivní — sérum v ředění 1 : 20 způsobuje úplnou zábranu hemolýzy při 1,5 MHD,
- č. 3 slabě pozitivní — sérum v ředění 1 : 10 způsobuje úplnou zábranu hemolýzy, v ředění 1 : 20 zábranu hemolýzy nad 50 %,
- č. 4 podezřelý — sérum v ředění 1 : 10 způsobuje úplnou zábranu hemolýzy, v ředění 1 : 20 zábrana hemolýzy pod 50 %,
- č. 5 negativní — sérum ani v ředění 1 : 10 nezpůsobuje úplnou zábranu hemolýzy,
- č. 6 negativní — jako u séra č. 5,
- č. 7 negativní — v ředění séra 1 : 10 je sice úplná zábrana hemolýzy, avšak sérová kontrola při 1,5 MHD vykazuje zábranu pod 50 %,
- č. 8 pozitivní — přesto, že sérová kontrola vykazuje při 1,5 MHD ještě zábranu hemolýzy pod 50 %, sérum je ještě pozitivní při 2,25 MHD při negativní kontrole. Jelikož však jde o sérum silně antikomplementární, nutno vyšetření opakovat s novým vzorkem krve.

hlavního pokusu

E	F	G	H	I	J	K	L
8 ‰	9 ‰	4 ‰	5 ‰	6 ‰	7 ‰	8 ‰	9 ‰
FR							
++++	++++	—	—	—	—	—	—
++++	++++	—	—	—	—	—	—
++++	+++	—	—	—	—	—	—
+++	++	—	—	—	—	—	—
+	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	++++	++++	+	—	—	—
—	—	+++	++	—	—	—	—
++++	++++	++++	++++	++	+	—	—
++++	++++	++++	++++	+	—	—	—
++++	++++	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
—	—	—	—	—	—	—	—
++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++	++++

Kontroly v hlavním pokuse:

Kontrola antigenu — řádek 17, sloupce A—F,
řádek 18, sloupce A—F,
řádek 19, sloupce A—F,

kontrola vyšetřovaného séra — sloupce G—L,

kontrola pozitivního séra — řádek 17, sloupce A—L,

kontrola negativního séra — řádek 18, sloupce A—L,

kontrola komplementu — řádek 19, sloupce G—L,

kontrola HS — řádek 20, sloupce A—L.

I když provádíme vyhodnocení séra zásadně při 1,5 MHD, začínáme při použití rozvedené řady komplementu s 1 MHD, abychom i v hlavním pokusu měli 1 MHD zachyceno jako kontrolu s každým vyšetřovaným sérem, neboť tím máme jistotu, že reakci odečítáme skutečně při 1,5 MHD. Kdybychom začínali v hlavním pokusu přímo s 1,5 MHD, mohlo by se stát, že bychom podle předběžné titrace hodnotili sice správně, ve skutečnosti však buď chybou při přípravě ředění komplementu pro hlavní pokus, či zeslabením komplementu nebo vlivem vyšetřovaného séra na komplement, bychom reakci mohli hodnotit při 1,25 MHD nebo při 1,75 MHD, což by pochopitelně mohlo výsledek zkreslit.

Komplement roztitrováváme po 0,25 MHD proto, abychom mohli vyhodnocovat i séra s menším antikomplementárním účinkem. Při silnějším antikomplementárním účinku séra však vyšetření raději opakujeme s novým vzorkem krve, i když nám rozvedená řada komplementu vyhodnocení umožňuje.

Při vlastním vyhodnocení vyšetřovaného séra, zda podle výsledku RVK jde o sérum pozitivní či negativní, vycházíme z tohoto hlediska:

1. sérum negativní — sérum ani v ředění 1 : 10 nezpůsobuje úplnou zábranu hemolýzy na + + + +,

2. sérum podezřelé — sérum v ředění 1 : 10 způsobuje úplnou zábranu hemolýzy na + + + +, v ředění 1 : 20 zábrana hemolýzy pod 50 %,

3. sérum slabě pozitivní — sérum způsobuje v ředění 1 : 10 úplnou zábranu hemolýzy na + + + +, v ředění 1 : 20 zábrana hemolýzy nad 50 % (+ + +),

4. sérum pozitivní — sérum ještě v ředění 1 : 20 způsobuje úplnou zábranu hemolýzy na + + + +,

5. sérum silně pozitivní — sérum v ředění 1 : 20, váže nejméně 2,25 MHD — reakce na + + + +.

Vzhledem k tomu, že po proběhlé infekci přetrvávají protilátky, zjistitelné RVK, i po odeznění infekce v séru krevním delší dobu, je pro konečné posouzení výsledku směrodatné druhé vyšetření séra, k němuž je krev zaslána za 7—14 dnů. Je-li při tomto druhém vyšetření zjištěno, že titr protilátek stoupl, jde o probíhající onemocnění, zůstane-li při druhém vyšetření titr protilátek stejný, případně nižší, jde o infekci odeznělou nebo dříve proběhlou latentní infekci.

Souhrn výsledků I. části

Serologická diagnostika toxoplazmózy je prováděna Sabin-Feldmannovým testem a reakcí vazby komplementu. Vzhledem k tomu, že obě tyto vyšetřovací metody nejsou standardizovány, není v jednotlivých laboratořích vyšetřovací po-

stup stejný, z čehož vzniká nejednotnost v posuzování výsledků a případné nesrovnalosti ve výsledcích jednotlivých laboratoří, zejména pokud jde o výši titru a vyhodnocení pozitivnosti séra.

K serologické diagnostice používáme kapkové metody reakce vazby komplementu, kterou provádíme dlouhodobým spojováním za chladu. Vazbu komplementu provádíme s rozvedenou řadou komplementu, která nám umožňuje přesné vyhodnocení vyšetřovaného séra včetně slabě pozitivních sér, jakož i sér s mírným antikomplementárním účinkem.

Toxoplazmový antigen připravujeme z chorioalantoidních blan kuřecích embryí, infikovaných kmenem *Toxoplasma gondii*.

Byla popsána titrace jednotlivých složek reakce vazby komplementu a vytyčeny hlavní zásady jednotného odečítání výsledků reakce, jakož i konečného vyhodnocení pozitivnosti séra na základě výsledku reakce vazby komplementu.

Токсоплазмоз собаки — результаты изучения серологической диагностики путем связывания комплемента

(I часть)

Серологическая диагностика токсоплазмоза производится тестом Сабин-Фельдмана и реакцией связывания комплемента. Ввиду того, что оба этих исследовательских метода не стандартизованы, технология исследования в отдельных лабораториях не одинакова, вследствие чего возникает неединство оценки результатов и возможные неувязки в результатах отдельных лабораторий, прежде всего что касается высоты титра и оценки позитивности сыворотки.

Для серологической диагностики используется капельный метод реакции связывания комплемента, который осуществляется долговременным холодным связыванием. Связывание комплемента проводится с разведенным рядом комплемента, который дает возможность точной оценки исследуемой сыворотки, включая слабо позитивные, а также и сывороток со слабым антикомplementарным действием.

Токсоплазмозный антиген готовится из хориоалантоидных пленок куриных эмбрионов, инфицированных штаммом *Toxoplasma Gondii*.

Была описана титрация отдельных элементов реакции связывания комплемента и указаны основные принципы единого отсчета результатов реакции, а также и окончательной оценки позитивности сыворотки на основании результата реакции связывания комплемента.

Toxoplasmose beim Hund — Ergebnisse eines Studiums serologischer Diagnostik mittels Komplementenbindung

(1. Teil)

Die serologische Diagnostik der Toxoplasmose wird mittels des Sabin-Feldmann-Testes und Reaktion der Komplementenbindung durchgeführt. Mit Rücksicht darauf, daß diese beiden Untersuchungsmethoden nicht standardisiert sind, ist der Untersuchungsvorgang in den einzelnen Laboratorien verschieden; daraus geht eine Uneinheitlichkeit der Beurteilung von Ergebnissen und eine eventuelle Nichtübereinstimmung der Ergebnisse einzelner Laboratorien hervor, vor allem in bezug auf die Titerhöhe und Auswertung der Serumpositivität.

Bei der serologischen Diagnostik gelangt die Tropfenmethode der Komplementenbindungs-Reaktion zur Anwendung; dies wird durch ein langfristiges Verbinden unter

Kälteeinfluß durchgeführt. Die Komplementenbindung wird mittels der entfalteten Komplementenreihe durchgeführt, durch welche eine genaue Auswertung des geprüften Serums einschließlich der schwach positiven Seren, sowie der Seren mäßig antikomplementärer Wirkung ermöglicht wird. Das Toxoplasmen-Antigen wird aus den chorioallantoischen Häuten der durch den Toxoplasma Gondii-Stamm infizierten Hühnerembryonen zubereitet.

Die Titration einzelner Komponenten der Komplementenbindungs-Reaktion wurde beschrieben und die hauptsächlichsten Grundsätze eines einheitlichen Abzählens der Reaktionsergebnisse, sowie der Schlußauswertung der Serumpositivität auf Grund des Ergebnisses der Komplementenbindungs-Reaktion wurden festgelegt.

Aktivita transaminázy kyseliny glutamové oxaloctové (GOT), transaminázy kyseliny glutamové pyrohroznové (GPT) a aldolázy v krevním séru zdravých a nemocných psů

**Активность трансаминазы глутаминовой и оксалоуксусной кислот (GOT),
трансаминазы глутаминовой пировиноградной кислоты (GPT) и алдолазы
в кровяном сыворотке здоровых и больных собак**

Die Aktivität der Transaminase der Glutamin-Oxalelessigsäure (GOT), der Transaminase der Glutamin-Brenztraubensäure (GPT) und der Aldolase im Blutserum gesunder und kranker Hunde

MVDr. L. ŠLESINGR

Došlo dne 17. 1. 1959

Ú v o d

Diagnostika jaterních chorob u psů není sice tak obtížná jako u velkých domácích zvířat, avšak častý výskyt a rozmanitost poruch jaterního parenchymu psů vyžaduje specifické metody jejich zjišťování. Systematicky prověřené některé zkoušky jako Takava-Arova, Groseho, Domanského, Weltmannova a kadmiová reakce zůstávají v diagnostice jaterních chorob u psů pouze zkouškami orientačními. Výsledky uvedených testů jsou ovlivněny celkovým zdravotním stavem a funkčním stavem některých orgánů, u psů obzvláště velmi často se vyskytujícím nefritickým nebo hepatonefritickým syndromem.

Významnější pro jaterní funkci u psů je zkouška jódová (Wolfův test) a brom-sulfaleinová. Zatížení jaterního systému alkoholem je pro psy nevhodné. Dostatečně neověřené zůstává zatěžávání jater u psů glukózou a galaktózou.

V posledních několika málo letech začala využívat lidská medicína k diagnostice jaterních a srdečních chorob aktivity některých enzymů. Do popředí se dostal hlavně průzkum aktivity transamináz (GOT a GPT) a aldolázy. Geneze a charakteristika uvedených enzymů byla popsána v práci (8, 9). Zde podáváme výsledky aktivity transaminázy kyseliny glutamové oxaloctové, transaminázy kyseliny glutamové pyrohroznové a aktivitu aldolázy v krevním séru jednak klinicky zdravých, jednak nemocných psů. Dále uvádíme výsledky aktivity citovaných enzymů u několika experimentálně použitých psů.

Metodika

Aktivita transaminázy GOT, GPT a aldolázy byla sledována u 30 klinicky zdravých psů. Stáří psů se pohybovalo v mezích od 6 měsíců do 8 roků. Rozdělení podle věku a pohlaví je následující:

Tabulka a)

Do 1 r.	1r.	2r.	3r.	4r.	5r.	6r.	7r.	8r.	
2 3	2 1	4 2	2 2	2 2	0 2	1 2	0 2	1 0	
5	3	6	4	4	2	3	2	1	součet

Krev k získání séra byla vždy odebírána v dopoledních hodinách, na lačno z *vena saphena* nebo *vena cephalica antebrachii*. Krev byla ponechána ve zkumavce až do sražení a potom odcentrifugována. Získané sérum bylo vyšetřováno na přítomnost enzymů vždy druhý den.

K určování transamináz byla zvolena metoda fotokolorimetrická podle Reitman-Frankela. Podrobný popis této metody je uveden v literatuře (6, 7). Fotometrická měření byla prováděna spektrofotometrem podle Kouckého, v kyvetách o průměru 12 mm, při 505 milimikrónech.

Aktivita aldoláz byla stanovena podle množství triosofosfátu, vzniklého štěpením fruktoso-1,6-difosfátu podle metody, jak ji uvádí Bruns a Puls (3). Aktivita enzymů je udána v mikromolech (1 ml/1 hod./37⁰ C).

K porovnání aktivity enzymů bylo provedeno dalších 30 měření u nemocných a pokusných psů, po aplikaci *CCL₄ per os* a po provedené thoracotomii.

Výsledky a diskuse

Na průkazném materiálu 30 klinicky zdravých psů byla získána tato průměrná aktivita: transamináza GOT 0,84, transamináza GPT 0,77 a aldoláza 0,72 mikromolu. Ševela udává výsledek aktivity transaminázy GOT u psa 0,96 mikromolu. Dalších literárních údajů jsme nenašli. Pro názornost porovnáme dosavadní výsledky aktivit transamináz a aldolázy u člověka a koně s našimi údaji u psa:

	GOT	GPT	aldoláza
člověk	0,6	0,5	0,3
kůň	3,03	0,14	0,71
pes	0,84	0,77	0,72

Jak vyplývá z porovnání je aktivita GOT u koně proti naměřeným hodnotám u člověka a psa vysoká. Naproti tomu má kůň velmi nízkou aktivitu transaminázy GPT. U člověka a psa je tedy poměr obou transamináz vyrovnaný. U psa jsme však naměřili v průměru asi o 20 mikromolů vyšší aktivitu obou transamináz nežli u člověka. Průměrná aktivita aldolázy u psa se však značně blíží hodnotám naměřeným u koně. Průměrná aktivita aldolázy u psa je více než dvakrát vyšší než

I. Aktivita transaminázy kyseliny glutamové oxaloctové (GOT), glutamové pyrohroznové (GPT) a aldoláz u klinicky zdravých psů v μM (1 ml/1 hod. (37°C))

P. č.	Pohlaví stáří	Transaminázy		Aldolázy	Poznámka
		GOT	GPT		
1	♂ 8r.	1,3	1,87	0,63	
2	♂ 2r.	0,7	0,6	1,83	
3	♂ 3r.	0,5	0,4	0,71	
4	♂ 4r.	0,7	1,0	0,60	výborný výž. stav
5	♂ 2r.	0,8	0,6	0,80	
6	♂ 1r.	0,9	0,8	0,50	
7	♂ 3r.	1,50	1,60	1,26	
8	♂ 4r.	0,7	0,9	1,00	
9	♂ 2r.	1,1	0,8	0,65	
10	♂ 9m.	0,6	0,5	0,75	špatný výž. stav
11	♂ 2r.	0,80	0,7	1,10	
12	♂ 1r.	1,1	1,3	0,78	
13	♂ 6r.	0,9	0,86	0,70	
14	♂ 7m.	1,3	0,9	0,70	
15	♀ 4r.	0,7	0,6	0,36	
16	♀ 3r.	0,6	0,6	0,56	
17	♀ 5r.	0,9	0,5	0,49	
18	♀ 2r.	0,5	0,9	0,82	20 dnů před porodem
19	♀ 9m.	0,7	0,5	0,40	
20	♀ 4r.	0,9	0,6	1,00	
21	♀ 1r.	0,5	0,5	0,47	
22	♀ 6r.	0,8	0,6	0,67	
23	♀ 7r.	1,00	0,7	0,59	
24	♀ 6r.	0,5	0,8	0,65	
25	♀ 6m.	0,78	0,50	1,00	14 dnů před porodem
26	♀ 2r.	1,2	0,9	0,60	
27	♀ 7r.	0,6	0,55	0,45	
28	♀ 3r.	1,1	0,8	0,66	
29	♀ 5r.	0,7	0,4	0,39	
30	♀ 7m.	0,9	0,8	0,70	
Průměrné hodnoty		0,84	0,77	0,72	

μM = mikromoly

II. Aktivita transaminázy kyseliny glutamové oxaloctové (GOT), glutamové pyrohroznové (GPT) a aldolázy u nemocných psů. μM (1 ml/1 hod.), (37° C)

Č. p.	Pohlaví stáří	Diagnóza	Transaminázy		Aldolázy	Pozn.
			SGOT	SGPT		
91	♀ 8r.	<i>Ascites</i>	0,5	1,1	0,83	
130	♀ 7r.	<i>Diabetes mellitus</i>	1,9	4,8	0,98	
867	♀ 3r.	<i>pneumonia cat.</i>	0,88	0,80	1,43	
872	♀ 2r.	<i>Dermatitis mycotica</i>	1,4	1,60	1,26	
877	♀ 6m.	<i>F. c. n.</i>	1,85	1,20	3,03	
892	♀ 3r.	<i>Bronchopneumonie vir.</i>	1,5	0,7	0,47	
907	♀ 1r.	virovní hyperkeratóza	8,4	1,2	2,33	
13	♀ 2r.	<i>Hepatitis tox.</i> před 24 hod. po apl. CCl_4 /24 hod.	0,7	0,8	0,50	
13	♀ 2r.	za 48 hod. po apl.	6,8	32,5	1,30	
			6,2	28,8	0,98	
14	♀ 3r.	<i>Hepatitis tox.</i> před 48 hod. po apl. CCl_4	0,5	0,65	0,40	
14	♀ 3r.	po další apl. CCl_4	5,8	32,0	4,99	
			6,2	38,7	8,65	
15	♀ 5r.	<i>Hepatitis tox.</i> před 24 hod. po apl. CCl_4	0,9	0,6	0,57	
		48 hod. po apl.	4,9	19,8	2,9	
		72 hod. po apl.	7,1	20,1	4,3	
		96 hod. po apl.	6,7	27,8	4,1	
			3,2	32,0	4,9	
16	♀ 4r.	Thoracotomie před 3 hod. po operaci	1,1	0,7	0,59	
		20 hod. po operaci	1,7	2,0	1,49	
		48 hod. po operaci	1,6	1,7	1,07	
		72 hod. po operaci	1,1	1,2	1,59	
			0,7	0,9	1,16	
17	♀ 5r.	Thoracotomie před oper.	0,7	0,6	0,36	
		20 hod. po operaci	1,6	1,8	1,09	
		48 hod. po operaci	0,6	1,3	0,76	
		72 hod. po operaci	0,5	1,0	0,89	

Za technickou spolupráci děkuji s. J. Továrkovi, III. interní klinika MU.

u člověka. Mezi pohlavím a stářím jsme nezaznamenali výrazných rozdílů. Poměr GOT. GPT je u psa vyšší než 1.

V jiné práci (9) jsme upozornili na výrazné zvyšování aktivity GOT u koní po aplikaci CCl_4 . Vedení myšlenkou použít posléze stanovení aktivity enzymů při diagnostice jaterních chorob psů, podali jsme psovi č. 13, 14 a 15 per os CCl_4 . Ve všech třech případech se aktivizovala velmi výrazně transamináza GPT. Dosažovala hodnot v průměru více než 40krát vyšších. Aktivita transamináz GOT se rovněž zvýšila, ale její aktivita zůstala asi 5 až 6krát nižší než GPT. U koní se aktivovala (9) po podání CCl_4 výrazně transamináza GOT, kdežto GPT se zvýšila pouze nepatrně. Aktivita aldolázy se zvedla u zmíněných třech psů méně

výrazně. U ostatních chorob v tabulce II, nebyly rozdíly od normálu tak markantní. Vyšší aktivity GPT jsme zaznamenali při *diabetes mellitus* a dále bylo výrazné zvýšení aktivity GOT zaznamenáno u psa s virózní hyperkeratózou. V obou případech šlo o těžké zánětlivé změny, a to pankreatu a plic.

Jak vyplývá z pokusu č. 13, 14 a 15, byla zvýšená aktivita transamináz a aldolázy podmíněna zánětlivým až nekrotickým pochodem jater, při kterém došlo k většímu uvolnění enzymů z jaterních buněk a vyplavení do plazmy krevní. Pře-
vážně se aktivovala transamináza GPT, takže poměr GOT : GPT je u těchto pokusných psů nižší než 1. Při akutních zánětech jater u člověka zaznamenal shodný poměr De Ritis (4), Bobek a spol. (1).

Je pravděpodobné, jak konečně vyplývá z případu č. 130 a 907, že aktivita enzymů v séru krevním se zvedá i při zánětlivých a nekrotických procesech ostatních orgánů, v našem případě pankreatu a plic. Takovéto změny se dají již klinicky nebo za pomoci běžného laboratorního šetření snadno zjistit.

Pokládáme-li výsledky aktivity transamináz a aldoláz našich třech experimentálních případů za hypotetické, pak úkolem další práce bude prověření chování uvedených enzymů v krevním séru při infekčních a idiopatických chorobách jater a psů.

Souhrn

Prokázali jsme u 30 klinicky zdravých psů aktivitu transamináz a aldoláz. Aktivita transaminázy GOT se pohybovala v průměru kolem 0,84 mikromolu, GPT 0,77 mikromolu a aldolázy 0,72 mikromolu.

Výrazného zvýšení aktivity transaminázy GPT jsme zaznamenali u psů po aplikaci CCl₄. Poměr GOT : GPT při zánětlivých až nekrotických procesech jaterních byl nižší než 1.

U ostatních nemocných a operovaných psů nastalo méně výrazné zvýšení aktivity enzymů v krevním séru.

Literatura

1. Bobek a spol.: Č. L. Č. č. 51, 1571, 1957. — 2. Bruns F. H., Neuhaus: J. Biochem. Zschr. 326, 4, 242, 1955. — 3. Bruns F. H., Puls W.: Klin. Wschr. 32, 27/28, 656, 1954. — 4. De Ritis F., Coltorti M., Giusti G.: Minerva Medica 47, 1, 1956.
5. Rudolph L. A. a spol.: J. Lab. et Clin. Med. 31, 1957. — 6. Reitman S., Frankel S.: Am. J. clin. Path. 28, 56, 1957. — 7. Ševela M.: Vnitřní lékařství IV, 8, 721, 1958. — 8. Šlesinger L.: Veterinářský časopis 1959, dosud nevyšlo. — 9. Šlesinger L.: Veterinární med. 1959, dosud nevyšlo. — 10. Švejcar J.: Čs. pediatrie XIII, 9, 797, 1958. — 11. Wroblewski F., La Due J. S.: Annals of Int. Med. 45, 5, 801, 1956.

**Активность трансаминазы глутаминовой и оксалукусусной кислот (GOT),
трансаминазы глутаминовой пировиноградной кислоты (GPT) и алдолазы
в кровяном сыворотке здоровых и больных собак**

У 30 клинически здоровых собак мы доказали активность трансаминазы и алдолазы. Активность трансаминазы GOT колебалась в среднем около 0,84 микромола, GPT 0,77 микромола и алдолазы — 0,72 микромола.

Типичное повышение активности трансаминазы GPT было установлено у собак после применения CCl_4 . Соотношение GOT : GPT при воспалительных и некротических процессах в печени был ниже 1.

У остальных больных и оперированных собак наблюдалось менее выраженное повышение активности энзимов в кровяном сыворотке.

Die Aktivität der Transaminase der Glutamin-Oxalessigsäure (GOT), der Transaminase der Glutamin-Brenztraubensäure (GPT) und der Aldolase im Blutserum gesunder und kranker Hunde

Bei 30 klinisch gesunden Hunden konnte die Transaminasen- und Aldolasenaktivität nachgewiesen werden. Die Aktivität der Transaminase GOT bewegte sich durchschnittlich um 0,84 Mikromol, der GPT-Transaminase um 0,77 Mikromol und der Aldolase um 0,72 Mikromol. Nach Applikation von CCl_4 bei Hunden stellten wir eine ausgeprägt erhöhte Transaminasenaktivität der GPT fest. Des Verhältnis GOT : GPT bei Leberentzündungen bis nekrotischen Leberprozessen wies eine Zahl unter 1 auf.

Bei den übrigen erkrankten und operierten Hunden trat eine weniger ausgeprägte Aktivität der Enzyme im Blutserum ein.

Zhodnocení Shopova viru infekčního fibromu pro ochranné očkování králíků proti myxomatóze

**Оценка вируса инфекционной фибромы Шопы для предохранительной
прививки кроликов против миксоматоза**

**Bewertung des Shop'schen Virus des infektiösen Fibroms für die Schutzimpfung von
Kaninchen gegen Myxomatose**

MVDr. J. KRÁL

Státní vědecký veterinární ústav, Praha

Došlo dne 6. I. 1959

Ú v o d

Po vzniku prvního ohniska myxomatózy ve Francii v roce 1952 postupovala myxomatóza nezadržitelně i do středoevropských států. Během letních měsíců 1955 začala se i u nás velmi rychle šířit a byly obavy, že zdecimuje chovy našich domácích králíků, a tím že bude ohrožena práce našich výzkumných a kontrolních ústavů, kde se používá králíků k experimentální práci. V této době bylo známo, že všechny dosavadní pokusy o přípravu spolehlivé očkovací látky z viru myxomatózy selhaly. O různých metodách oslabení viru myxomatózy referovali více autorů. Resende, Gartia, Sanchis - Bayarri (11) oslabovali virus myxomatózy formolem. Byla-li takto připravená anavakcína aplikována králíkům ve velkých dávkách, získalo jejich sérum lehkou virulicidní schopnost, ale králíci nikdy nezískali dostačující stupeň aktivní imunity a neodolali minimálním infekčním dávkám viru. Beller, Bieling (2) uvádějí, že pasážemi na allantoidní bláně nebo intracerebrálními pasážemi na králících, lze virus myxomatózy oslabit do té míry, že králíci jím infikovaní přestojí infekci. Toto oslabení virulence viru myxomatózy se ukázalo jen dočasným, zatím se nezdařilo sníženou virulenci viru myxomatózy stabilizovat (5). Podle Dumase (3) nelze imunizovat králíky virem oslabeným teplem ani antibiotiky, umrtvený virus nemá dostatečné imunogenní schopnosti. Sérum králíků, kteří se uzdravili z myxomatózy a kteří byli hyperimunizováni má v pasivní imunizaci jen nepatrný protektivní účinek, pasivně imunizovaní králíci neodolali minimálním infekčním dávkám. Pokud se u jednotlivých králíků vyvine aktivní imunita, nepřenáší se na potomstvo. Thompson a Posler (citov. podle Dumase, 3) sdělují, že se jim zdařilo imunizovat králíky živým virem myxomatózy, když je vložili do kletcí, v nichž byla udržována teplota na 40°C; králíci odolali virulentním kmenům myxomatózy a v jejich séru bylo možno prokázat protilátky seroneutralizačním testem. Prové-

ření tohoto údaje nepotvrdilo všeobecnou použitelnost této metody u plemen domácího králíka. Vzhledem k tomu, že oslabený virus není stálý ve své snížené virulenci a že umrtvený virus myxomatózy nemá dostatečnou imunogenní schopnost, zůstává dosud jediným prostředkem pro aktivní ochranu králíků před letálním průběhem myxomatózy fenomen interference při použití Shopova viru infekčního fibromu.

Když se u nás zaváděla první opatření proti myxomatóze, neměli jsme vlastních zkušeností s účinností a spolehlivostí komerčních vakcín připravovaných z Shopova viru infekčního fibromu a používaných v širokém měřítku k preventivnímu očkování domácích králíků proti myxomatóze v západních státech. Vakcína se k nám nedovážela a nebyla známa její účinnost pro plemena našich domácích králíků. Cílem této práce bylo zhodnotit protektivní účinek Shopova viru infekčního fibromu u plemen našich domácích králíků.

Metodika

Pro pasážování viru infekčního fibromu a pro přípravu vakcíny byla použita metodika Pasteurova ústavu. Tkáň infekčních fibromů králíka byla asepticky roztřena a emulgována ve fyziologickém roztoku v poměru 1 : 10. Emulze byla vstříkována podkožně na více místech ve hřbetní krajině, a to v dávkách 0,5 ml.

I. Tabulka pokusů o protektivním

24 hodin				Interval od vakcinace Shopovým virem 48 hodin	
Králík číslo	Rasa	Způsob infekce	Nález	Králík číslo	Rasa
1861	Činč.	Subkut.	Myxomatóza, úhyn 7. den	922	Víd. modr.
1860	Kříž.	Konj.	Myxomatóza, úhyn 11. den	1862	Kříž.
5 dnů				7 dnů	
456	Český str.	Subkut.	Protrahovaná myxomatóza úhyn 27. den	1101	Český str.
512	Kříž.	Subkut.	bez nálezu	1115	Kříž.
624	Kříž.	Konj.	bez nálezu	1106	Kříž.
6 měsíců				Kontroly	
624	Kříž.	Subkut.	bez nálezu	111711	Činč.
1101	Český str.	Subkut.	bez nálezu		
1113	Kříž.	Subkut.	bez nálezu	1110	Kříž.
1112	Činč.	Subkut.	bez nálezu		

Jakmile se po 8–12 dnech vytvořily v podkoží fibromy dostatečné velikosti (fazole až bobu) byli králíci éterizováni a asepticky byla odebrána fibromatózní tkáň. Mezi jednotlivými pasážemi byla fibromatózní tkáň uchovávána jednak v 50% glycerinu, jednak ve zmrazeném stavu.

Pasažování viru infekčního fibromu

V provedených 46 pasážích na králících byl virus stabilisován, inofenzivní, při podkožní aplikaci v koncentrovaném stavu (1 : 10) vyvolával tvorbu fibromů pouze na místě aplikace v podkoží. Fibromy dosahovaly maximální velikosti do 10–14 dnů, za dalších 14–28 dnů se pak zresorbovaly. Histologicky se fibromy jeví jako benigní vřetenobuněčný fibrom. Generalizace fibromatózy po podkožní a intrakutánní aplikaci nebyla pozorována v žádné pasáži. Při zředění Shopova viru 1 : 1000 vytvářely se v podkoží jen drobné, sotva znatelné fibromy velikosti prosa. V pasážích se dobře osvědčila intrakutánní aplikace viru fibromu, po níž se vytvářely fibromy konstantněji a v dostatečné velikosti, zatímco při podkožní aplikaci byl vývoj fibromů pozvolnější a méně intenzivní. Ve zmrazeném stavu uchovával si virus své biologické vlastnosti po dobu 7–9 měsíců. Glycerinovaný virus projevoval proti viru uchovávanému při -30°C od 4–6 týdne menší virulenci (projevující se tím, že po podkožní aplikaci se vytvářely jen velmi drobné fibromy (velikosti prosa až krupky), které se záhy zresorbovaly.

účinku Shopova viru

do infekce virem myxomatózy

72 hodin

Způsob infekce	Nález	Králík číslo	Rasa	Způsob infekce	Nález
Subkut.	Myxomatóza, úhyn 23. den	1856	Činč.	Subkut.	Protrahovaná myxomatóza úhyn 36. den
Konj.	Myxomatóza, úhyn 16. den	545	Kříž.	Konj.	Lehčí myxomatóza, uzdravení za 9 týdnů

12 dnů

Subkut.	bez nálezu	1112	Činč.	Subkut.	bez nálezu
Subkut.	bez nálezu	114	Kříž.	Subkut.	Protrahovaná myxomatóza, úhyn 47. den
Subkut.	bez nálezu	620	Činč.	Subkut.	bez nálezu

hlavního pokusu

Kontroly 6. měs. pokusu

Konj.	Myxomatóza, úhyn 12. den	1127	Kříž.	Konj.	Myxomatóza, úhyn 17. den
Subkut.	Myxomatóza, úhyn 15. den	1128	Kříž.	Subkut.	Myxomatóza, úhyn 15. den

Příprava vakcíny

Převzatá metodika přípravy vakcíny byla modifikována v tom, že místo subkutánní aplikace viru fibromu u králíků bylo použito intrakutánní aplikace emulze v poměru 1 : 10. Asepticky odebraná fibromatózní tkáň byla rozetřena a emulgována ve fyziologickém roztoku v poměru 1 : 250 a v tomto zředění byla emulze používána bez přísady konzervačních látek jako vakcína.

Protektivní účinek Shopova viru

Protektivní účinek Shopova viru infekčního fibromu byl hodnocen na 15 králících našich plemen a jejich křížencích. Králíci byli naočkováni 1 ml vakcíny Shopova viru subkutánně a v odstupňovaných intervalech (24, 48, 72 hodin, 5, 7 a 12 dnů) byli pak infikováni podkožně nebo konjunktiválně virem myxomatózy v dávce asi 1000 infekčních jednotek.

Čtyři vakcinovaní králíci (č. 624, 1101, 1113, 1112), kteří po první infekci neprojevovali žádné příznaky myxomatózy, byli po dalších 6 měsících reinfikováni podkožně dávkou asi 10 000 infekčních jednotek. Za kontroly sloužili nevakinovaní králíci. Ve všech pokusech bylo použito terénního viru myxomatózy, který byl uchováván ve zmrazeném stavu (-30°C).

Ke zjištění, zda infekce virem fibromu a virem myxomatózy nemá vliv na bílkovinné spektrum séra, byla ve spolupráci s Výzkumným veterinárním střediskem v Praze provedena elektroforézou séra 2 králíků během akutního průběhu myxomatózy a séra 2 králíků po vakcinaci Shopovým virem.

Z technických důvodů mohly být pokusy provedeny jen ve velmi omezeném rozsahu. Uspořádání, způsob provedení pokusů a dosažené výsledky jsou patrné z tabulky.

Výsledky pokusů

Protektivní účinek Shopova viru infekčního fibromu vůči myxomatóze se projevil zčásti již po 72 hodinách. Po infekci myxomem nevznikla akutní, nýbrž jen protrahovaná myxomatóza mírnějšího průběhu, končící u jednoho ze dvou králíků uzdravením. Po infekci virem myxomatózy za tři dny po vakcinaci v jednom případě ze tří a za 12 dnů po vakcinaci rovněž v jednom případě ze tří vyvinula se protrahovaná myxomatóza. V ostatních případech (od tří dnů po vakcinaci) zůstali pokusní králíci po infekci virem myxomatózy bez příznaků, dvě kontroly uhynuly. U čtyř vakcinovaných králíků reinfikovaných po 6 měsících virem myxomatózy nevznikly během dalších 2 měsíců žádné příznaky infekce, zatímco dvě kontroly uhynuly. Elektroforézou séra králíků nebyly prokázány specifické změny bílkovinného spektra při akutní myxomatóze ani po aplikaci viru infekčního fibromu.

Diskuse

Ochranné očkování králíků proti myxomatóze virem infekčního fibromu se zakládá na Shopově poznatku z roku 1931, že králík druhu *Sylvilagus*, který je naočkován virem myxomatózy je rezistentní pro inokulaci viru infekčního fibromu a naopak. Toto platí i pro evropského králíka druhu *Oryctolagus*. V západních státech bylo od roku 1953 používáno ochranné očkování králíků domácích proti myxomatóze virem infekčního fibromu v těch územích, kde se v terénu vyskytovala myxomatóza u divokých králíků. Poznatky o hodnotě a významu tohoto způsobu

ochrany králíků před myxomatózou byly v posledních letech získány v Evropě. R a m o n zaujímal již před zaváděním výroby vakcíny z infekčního fibromu skeptické stanovisko k tomuto způsobu ochrany domácích králíků před myxomatózou, jiní autoři se vyslovovali o této metodě příznivěji. R o w e, M a n s i, H u d s o n (10) zjistili experimentálně, že virus fibromu chránil králíky před myxomatózou v 71–93 %, zatímco v 7–21 % (podle stupně virulence viru myxomatózy) vakcinace letálnímu průběhu myxomatózy nezabránila. R i t c h i e (8) odhaduje průměrnou účinnost viru infekčního fibromu na 88,9 %. R o e m m e l e (9) uvádí, že králíci očkováni virem infekčního fibromu jsou přes 6 měsíců vzdorní vůči silné infekci myxomatózou. Srovnáme-li literární údaje s výsledky vlastních pokusů je patrné, že také u našich plemen domácího králíka není protektivní účinek Shopova viru dostatečně spolehlivý. Tato okolnost by nebyla hlavní překážkou pro používání takového způsobu ochrany domácích králíků proti myxomatóze. Z provedených pokusů však vystupuje do popředí druhá, z hlediska epizootologického velmi důležitá okolnost, že při částečném protektivním účinku viru infekčního fibromu probíhá při následující infekci myxomatózou u některých jedinců myxomatóza ve vleklé formě. Takoví králíci se stávají na delší dobu nositeli a vylučovateli viru myxomatózy. Za těchto okolností nelze považovat za vhodné všeobecné provádění vakcinace domácích králíků Shopových virem fibromu, neboť v chovech, myxomatózy prostých by se tato nákaza mohla stát po čase endemickou. Při bezprostředním ohrožení myxomatózou lze uvažovat o možnosti použití vakcinace Shopovým virem v těch plemenářsky cenných chovech nebo velkochovech králíků produkovaných zejména pro laboratorní účely, které jsou pod stálou veterinární kontrolou, zaručující včasné odstranění jedinců, u nichž by se vyskytla myxomatóza ve vleklé formě.

S o u h r n

Experimentálně bylo zjištěno, že Shopův virus infekčního fibromu byl v 46 pasážích na králících inofenzivní, po podkožní a intrakutánní aplikaci vyvolával jen přechodné, lokalizované fibromy. Vakcinace Shopovým virem chránila králíky našich plemen před letálním průběhem myxomatózy od 5. dne po vakcinaci po dobu nejméně 6 měsíců. Ochranný účinek Shopova viru nebyl zcela spolehlivý; u dvou z devíti vakcinovaných králíků vznikla po experimentální infekci myxomem protrahovaná myxomatóza, a to u jednoho králíka (ze tří) infikovaného 5 dní po vakcinaci a u jednoho (ze tří) za 12 dní po vakcinaci. Pro nebezpečí endemického průběhu myxomatózy v chovech domácích králíků nelze považovat za vhodné všeobecné provádění vakcinace Shopovým virem. Tento způsob ochrany králíků před myxomatózou lze použít v individuálních případech, jsou-li chovy pod veterinární kontrolou, zaručující včasné vyřazení králíků, u nichž by se projevila myxomatóza ve vleklé formě.

L i t e r a t u r a

1. Barthelmy: *Revue forest. française*, Paris, 1933, 10. — 2. Beller, Bie-ling: *Viruskrankheiten der Haus- und Laboratoriumstiere*. Lipsko 1950. — 3. Du-mas: *Les animaux du laboratoire*, Paris 1953. — 4. Jacotot, Valée, Virat: *Bull. Acad. Vét. de France* 1954, 3, 105. — 5. Jacotot, Valée, Virat: *Bull. Acad. Vét. de France* 1954, 8. — 6. Jacotot, Valée, Virat: *Ann. Inst. Past.* 1956, 6, 779-783. — 7. Král J.: *Veterinářství* 1957, 7, 2, 48-49. — 8. Ritchie: *Vet. Record* 1954, 66, 796. — 9. Roemmele: *Berlin. u. Münch. tierärztl. Wschr.* 1958, 71, 7, 128-130.

— 10. Rowe, Mansi, Hudson: J. Comp. path. 1956, 66, 290. — 11. Sanchis, Bayarri, Nilson, Resende, Martinez: Bull. Acad. Vét. de France 1953, 361-365. — 12. Saurat, Lantié: Rev. de Méd. Vét. 1953, 104, 449. — 13. Seifried: Die Krankheiten des Kaninchens. Berlin 1937. — 14. Shoop: Deutsche Tierärztl. Wschr. 1954, 7, 285. — 15. Stöckl: Wiener Tierärztl. Monatschrift 1956, 43, 150-157, 227-241, 403-430.

Оценка вируса инфекционной фибромы Шопа для предохранительной прививки кроликов против миксоматоза

Экспериментальным путем было установлено, что вирус инфекционной фибромы Шопа в 46 пассажах был у кроликов безвредным; после подкожного и интракутанного введения он вызвал лишь временные, локализованные фибромы. Вакцинация вирусом Шопа предохраняла кроликов наших пород от смертельного хода миксоматоза от 5-го дня после вакцинации в течение не менее 6 месяцев. Защитное действие вируса Шопа не было вполне надежным: у двух из 9 вакцинированных кроликов после экспериментальной инфекции миксомом образовался длительный миксоматоз, а именно у одного кролика (из трех), инфицированного через 5 дней после вакцинации и у одного (из трех) через 12 дней после вакцинации. Ввиду опасности эндемического хода миксоматоза в домашнем кролиководстве, массовое проведение вакцинации вирусом Шопа нельзя считать пригодным. Этот способ защиты кроликов от миксоматоза можно применить в индивидуальных случаях, когда кролиководческие фермы находятся под ветеринарным надзором, обеспечивающим своевременную выбраковку кроликов, у которых проявился бы миксоматоз в хронической форме.

Bewertung des Shop'schen Virus des infektiösen Fibroms für die Schutzimpfung von Kaninchen gegen Myxomatose

Wie experimentell festgestellt wurde, erwies sich der Shop'sche Virus des infektiösen Fibroms bei 46 Passagen an Kaninchen als inoffensiv; derselbe Virus erweckte nach subkutaner und intrakutaner Applikation nur vorübergehende, lokalisierte Fibrome. Die Vakzination mit dem Shop'schen Virus schützte die Kaninchen unserer Rassen vor letalem Verlauf der Myxomatose, und zwar vom fünften Tag nach Vakzination für eine Dauer von minimal sechs Monaten. Die Schutzwirkung des Shop'schen Virus war nicht vollkommen verlässlich: nach einer experimentellen Infektion durch Myxomatose entstand in zwei Fällen von neun vakzinieren Kaninchen eine protrahierte Myxomatose, und zwar bei einem Kaninchen (von drei Stück), welches fünf Tage nach Vakzination, und bei einem Kaninchen (von drei Stück), welches 12 Tage nach Vakzination infiziert wurde. Da eine Gefahr von endemischem Myxomatosenverlauf bei den Beständen von Hauskaninchen bestand, kann eine allgemeine Durchführung der Vakzination mit dem Shop'schen Virus nicht für zweckmäßig gehalten werden. Diese Schutzmaßnahme gegen Myxomatose bei Kaninchen kann in individuellen Fällen zur Anwendung gelangen, wenn die Bestände unter Veterinärkontrolle stehen, die eine rechtzeitige Beseitigung von den durch chronische Myxomatose befallenen Kaninchen garantiert.

Stanovení transaminázy kyseliny glutamové-oxalocetové a glutamové-pyrohroznové v séru krevním u koní

I. sdělení

Определение трансаминаза кислот глутаново-оксалоуксусной и глутаново-пировиноградной в кровяной сыворотке лошадей

Die Bestimmung von Transaminase der Glutamin-Oxaleessigsäure und der Glutamin-Brenztraubensäure im Blutserum der Pferde

M. HORÁK, J. JÍCHA, ZD. SOVA

Ústřední biochemická laboratoř fakultní nemocnice KÚNZ, Hradec Králové,
přednosta MUDr. Josef Jícha

I. interní a infekční oddělení Krajské veterinární nemocnice, Pardubice,
přednosta MVDr. ZD. Sova

Došlo dne 28. XII. 1958

Úvod

S rostoucím významem biochemie je věnována stále větší pozornost enzymatickým pochodům. V humánní medicíně bylo věnováno velmi mnoho prací enzymatické transaminaci, která spočívá v reversibilním přenosu α -amino dusíku aminokyseliny na α -ketokyselinu za tvorby druhé aminokyseliny a jiné ketokyseliny. Tento proces objevili v r. 1937 Braunstein a Kricmanová a enzym nazvali aminoferázou. V současné době se používá více Cohenem navržený název transamináza.

V klinice našly největšího použití transaminázy kyselin glutamové-oxalocetové (GOT) a kyseliny glutamové-pyrohroznové (GPT), které jsou nejvíce aktivní. Transaminační reakce probíhá podle schématu:

1. GOT

kyselina asparagová + kyselina α ketoglutarová $\rightleftharpoons$
kyselina glutamová + kyselina oxalocetová

2. GPT

alain + kyselina α -ketoglutarová $\rightleftharpoons$
kyselina glutamová + kyselina pyrohroznová

Cohen a Herkhius (1) sledovali aktivitu transamináz v rozličných tkáních a zjistili, že různé orgány liší se od sebe aktivitou transamináz.

Zvýšená aktivita těchto enzymů v humánní medicíně byla pozorována a potvrzena četnými autory cizími i našimi, zejména u infarktů myokardu a jaterních chorob.

Aktivita enzymu se obecně hodnotí podle úbytku substrátu nebo úbytku koenzymu či podle přírůstku produktu vznikajícího při enzymatické reakci. K určování aktivity transaminázy byly použity reakce založené na principu poslední jmenovaném.

Karmen, Henley a Pollard, Wróblevski a La Due (2, 3, 4), popsali spektrofotometrická stanovení aktivity enzymu, využívající k určení množství vzniklých ketokyselin pomocné indikátorové reakce.

Určování GOT probíhá na principu této reakce: dehydrogenáza kys. jablečné
kyselina oxaloctová + redukovaný difosfopyridinnukleotid $\xrightleftharpoons{\hspace{1.5cm}}$
kyselina jablečná + difosfopyridinnukleotid

Určování GPT probíhá na principu následující reakce: dehydrog. kys. mléčné
Kyselina pyrohroznová + redukovaný difosfopyridinnukleotid $\xrightleftharpoons{\hspace{1.5cm}}$
kyselina mléčná + difosfopyridinnukleotid.

V obou případech dochází k oxydaci redukovaného difosfopyridinnukleotidu na difosfopyridinnukleotid a výsledek reakce se hodnotí podle úbytku redukovaného difosfopyridinnukleotidu v ultrafialové části spektra (340 m μ). Metoda je velmi rychlá, ale vyžaduje spektrofotometr s ultrafialovou oblastí spektra a těžko dostupné enzymy a koenzymy.

Wróblevski, Karmen a La Due (5) popsali metodu, založenou na stanovení enzymatickou reakcí vzniklé kyseliny glutamové, kterou izolovali od ostatních reakčních produktů chromatografií na papíře. Řada dalších autorů vycházela ze stejného principu, ale izolaci kyseliny glutamové prováděla elektroforeticky. U nás použili této metody Turský a Bielik (6) a Ševela (7). Opačného průběhu reakce použil Ševela (8), který určoval elektroforetickým dělením vzniklé množství kyseliny asparagové nebo alaninu.

Cabaud, Umbreit, Dubach (9, 10, 11) použili k hodnocení aktivity GOT určování množství kyseliny oxaloctové vzniklé enzymaticky. Tuto kyselinu převedli anilincitrátem na kyselinu pyrohroznovou.

Wróblevski (12) použil stejného principu k stanovení aktivity GPT. V obou reakcích se určuje množství kyseliny pyrohroznové jako hydrazon této kyseliny.

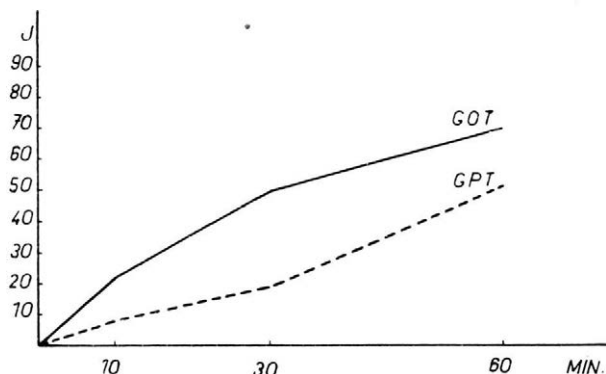
Metoda Reitmana a Frankela (13) u nás uvedená Ševelou (14) je zjednodušením metody Cabauda a Wróblevského. Reitman a Frankel používají velmi nízké koncentrace substrátu (kyseliny α -ketoglutarové) a stanovují hydrazon kyseliny pyrohroznové na základě její třikrát vyšší absorpce proti hydrazonu kyseliny α -ketoglutarové.

Z uvedených metod jsme přezkoušeli metodu založenou na elektroforetickém dělení kyseliny glutamové, metody fotometrické podle Wróblevského (12) a Cabauda (9) a metodu podle Reitmana a Frankela (13). Pro vlastní naši práci jsme použili metody Wróblevského (12) a Cabauda (9), které nejlépe vyhovovaly našim účelům.

Metodika

Reagencie: 1. substrát pro GOT: 2,66 g kyseliny d l-asparagové, 2 g primárního fosforečnanu draselného a 0,6 g kyseliny α -ketoglutarové se rozpustí v normálním louhu draselném upraví se pH roztoku na 7,4 a objem se doplní na 100 ml destilovanou vodou. Roztok se uchovává v lednici.

Graf 1: Vliv inkubace na průběh transaminační reakce. Teplota 26° C, ro. mezi 10 až 60 minut



2. Substrát pro GPT: 1,77 g d l-alaninu, 2 g primárního fosforečnanu draselného a 0,6 g kyseliny α -ketoglutarové se rozpustí v normálním roztoku louhu draselného; pH roztoku se upraví na 7,4 a objem se upraví na 100 ml destilovanou vodou. Roztok se uchovává v lednici.

3. 100 g kyseliny trichloroctové se rozpustí ve 100 ml destilované vody.

4. 5 g kyseliny citronové se rozpustí v 5 ml destilované vody a přidá se 5 ml anilinu.

5. 0,1 g 2,4-dinitrofenylhydrazinu se rozpustí ve 20 ml koncentrované kyseliny solné a přidá se 80 ml destilované vody.

6. Toluén destilovaný.

7. 2,5 g hydroxydu draselného se rozpustí ve 100 ml 96% etanolu.

8. standardní roztok kyseliny pyrohroznové: rozpustí se: 1 g kyseliny pyrohroznové ve 100 ml destilované vody. Roztok se uchovává v lednici.

Provedení:

Stanovení GOT: Do 2 zkumavek odpipetujeme 0,5 ml séra a 0,5 ml destilované vody. Do obou zkumavek přidáme 0,5 ml substrátu pro GOT.

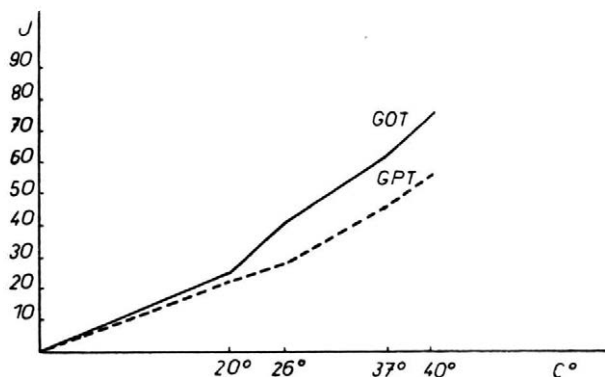
K první zkumavce, která slouží jako slepý pokus, přidáme ihned 1 kapku roztoku č. 3 k zastavení enzymatického procesu a 1 kapka roztoku č. 4.

Obě zkumavky inkubujeme ve vodní lázni při teplotě 26° C po 20 min. Po skončené inkubaci přidáme do druhé zkumavky, sloužící jako vlastní pokus, po 1 kapce roztoku č. 3 a č. 4.

Zkumavky necháme stát 20 min. při pokojové teplotě. Do obou zkumavek přidáme 0,5 ml roztoku č. 5, promícháme a necháme stát přesně 5 min. Přidáme do každé zkumavky po 2 ml toluenu a důkladně vytřepeme. Vzniklou emulzi odcentrifugujeme a odpipetujeme po 1 ml toluenové vrstvy do nových zkumavek. Do každé zkumavky přidáme 3 ml roztoku č. 6, promícháme a vzniklé červenohnědé zabarvení změříme na fotometru při vlnové délce 490 m μ proti destilované vodě po deseti minutách stání.

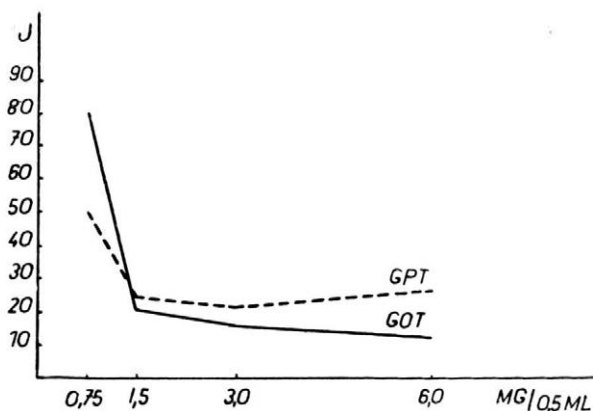
Výpočet: od extinkce vlastního pokusu odečteme extinkci slepého pokusu a výslednou hodnotu nalezneme v kalibračním grafu.

Kalibrace: Připravíme standardní roztoky kyseliny pyrohroznové obsahující v 1 ml: 0; 50; 100; 200; 300; 400; 500 gama kyseliny pyrohroznové. Pipetujeme k tomu 0 ml; 0,5 ml; 1 ml; 2 ml; 3 ml; 4 a 5 ml roztoku č. 8 a doplníme do 100 ml destilovanou vodou. S těmito roztoky provedem celý postup jako při zpracování séra a zhotovíme kalibrační graf.



Graf 2: Vliv teploty na průběh transaminační reakce. Doba 20 minut, rozmezí 20 až 40 °C

V další práci jsme sledovali vliv množství substrátu na množství vytvořených ketokyselin.



Graf 3: Vliv množství substrátu na množství vytvořených ketokyselin

Jako jednotka transaminázy je definována aktivita enzymu v 1 ml séra, který vytvoří během 20 min. při teplotě 26 °C chromogenní materiál odpovídající 1 gama kyselině pyrohroznové.

Stanovení GPT: Způsob stanovení GPT je shodný s postupem uvedeným pro GOT. Pouze jako substrátu použijeme substrátu pro GPT (roztok č. 2) a nepřidáváme roztok anilincitrátu (roztok č. 4).

V další práci jsme si ověřili nejvýhodnější podmínky pro průběh této reakce.

Pro transaminaci nalezní jsme ve shodě s Wróblevským optimální hodnotu pH mezi 7,4 až 7,8.

Přezkoušeli jsme závislost na době inkubace. Reakci jsme prováděli při 26 °C v rozmezí od 10 do 60 min. S dobou inkubace stoupá množství vytvořeného chromogenního materiálu.

Vyzkoušeli jsme, jaký vliv má teplota na průběh transaminační reakce v rozmezí od 20 do 40 °C po dobu 20 min. Se stoupající teplotou stoupá množství vytvořeného chromogenního materiálu.

Se stoupajícím množstvím použité kyseliny α -ketoglutarové klesá množství vytvořeného hydrazonu kyseliny pyrohroznové.

Charakter barevné reakce je stejný jako je popisován u stanovení kyseliny pyrohroznové. Absorbční maximum je při 440 m μ s následným poklesem a prodlevou při 490 až 530 m μ . Kalibrační křivka je lineární. Intenzita zabarvení od 10 do 120 min. je prakticky neměnná.

Reprodukovatelnost metody:

Reprodukovatelnost metody jsme přezkoušeli opakovaným vyšetřením jednoho séra v 10 paralelních vzorcích a našli jsme tak při sériovém provádění průměrnou chybu pro GPT 6,9 % a pro GOT 6,3 %.

Normální hodnoty u lidí:

Stanovili jsme normální hodnoty u 9 dárců krve. Hodnoty se pohybovaly pro GOT od 9,2 do 39,4 j a pro GPT od 1,2 do 32,6 j.

1. Normální lidské hodnoty GOT a GPT u devíti dárců krve

Číslo	GOT	GPT
1.	9,9 j	18,3 j
2.	25,2 j	6,1 j
3.	12,6 j	11,6 j
4.	9,2 j	1,2 j
5.	39,4 j	19,5 j
6.	25,8 j	11,1 j
7.	29,6 j	10,5 j
8.	22,8 j	32,6 j
9.	11,1 j	4,9 j

Stanovili jsme hladiny transamináz u 22 koní léčených většinou na chirurgickém oddělení, u nichž jsme v žádném případě nemohli předpokládat onemocnění jater nebo myokardu či onemocnění centrálního nervového systému.

Normální hodnoty jsme našli pro GOT v průměru 210 j. (max. 268 j, min. 143 j). Proti tomu hodnoty GPT nacházeli jsme v průměru 6,34 j. (max. 14,9 j, min 0,7 j).

II. normální hodnoty GOT a GPT u koní se zdravými játry

Jméno koně	Číslo chor.	Klinická diagnóza	GOT	GPT
Karel	325/CH-58	tržná rána	242 j	2,8 j
Fricke	318/CH-58	castrandus	218 j	12,6 j
Rapík	299/CH-58	tržná rána	268 j	3,5 j
Šimla	312/CH-58	kopná rána	255 j	7,0 j
Jiřina	343/CH-58	loketní boule	227 j	8,4 j
Bobík	303/CH-58	kulhání	250 j	8,4 j
Minda	328/CH-58	tržná rána	243 j	9,7 j
Vranka	298/CH-58	zhmoždění	256 j	12,6 j
Minda	291/CH-58	kulhání	252 j	4,9 j
Hnědka	294/CH-58	bodná rána	204 j	1,75 j
Gusta	340/CH-58	rakovina kopyta	200 j	11,4 j
Hnědák	294/CH-58	rakovina kopyta	225 j	7,0 j
Braun	240/I-58	vyčerpání	211 j	7,9 j
Kája	317/CH-58	kulhání	247 j	14,9 j
Nauki	405/CH-58	zánět kloubu	164 j	4,7 j
Vlasta	407/CH-58	bodná rána	162 j	0,8 j
Linda	381/CH-58	kýla	167 j	2,3 j
Fricke	401/CH-58	zášlap	143 j	2,3 j
Karel	408/CH-58	zánět kloubu	156 j	4,7 j
Kája	307/CH-58	plecové kulhání	197 j	1,5 j
Vana	382/CH-58	zánět šlach	183 j	9,5 j
Grom	4/I-58	pokusný	148 j	0,7 j

Diskuse

Z metod ke stanovení GOT a GPT vyzkoušeli jsme tři, jevící se nám jako nejschůdnější a za našich podmínek proveditelné. Metoda elektroforetická, která dávala v jednotlivých vyšetřeních velmi dobré výsledky se nehodí k rutinnímu provádění pro velkou náročnost a zdoluhavost. Proti tomu metoda Reitmanova a Frankelova je ve svém provedení velmi jednoduchá, ale její nevýhodou je nutné opakování analýzy u sér s vysokou hladinou transamináz, kdy je třeba sérum ředit deset až čtyřicetkrát (14). Pro přesné stanovení u sér, jejichž aktivitu nemůžeme předem odhadnout, to znamená provádět analýzu několikrát s různě ředěným sérem. Tím se stanovení prodlužuje. Zvolili jsme proto metodu Cabauda (9) a Wróblevského (12), kteří používají nadbytek substrátu, jehož množství je dostatečné i pro séra s vysokou aktivitou enzymu. Při sledování podmínek reakce jsme našli shodně s Wróblevským optimum pH mezi 7,4–7,8. Za důležité považujeme upozornit na stoupání intenzity zabarvení s prodlužovanou dobou inkubace a stoupající teplotou. Nedodržení těchto podmínek znamenalo by falešné výsledky a naměřené hodnoty by neodpovídaly jednotce definované Wróblevským. Zvýšená aktivita séra při nedostatku substrátu nepřipadá u metody námi použité v úvahu, poněvadž pracujeme vždy s nadbytkem substrátu. Tato závislost však má význam při použití metody Reitmanovy a Frankelovy.

Hladinu transamináz může podstatně ovlivnit případná hemolýza krve. Wróblevski uvádí v hemolyzované krvi desetkrát zvýšenou GOT a pětinasobné zvýšení aktivity GPT. Aktivita enzymů je poměrně stálá. Wróblevski uvádí (5), že aktivita enzymu se do dvou týdnů v lednici nemění. Ve vlastním pokusu jsme se přesvědčili, že při uchovávání séra v lednici při $+4^{\circ}\text{C}$ nedochází ke změně aktivity. Změny aktivity při pokojové teplotě jsme sami nesledovali. Wróblevski nepozoroval při pokojové teplotě změny do 96 hodin. Proti tomu však pozoroval Dubach pokles aktivity v jednom případě zřetelný již po 4 hodinách a ve druhém po 24 hodinách při pokojové teplotě.

Normální hodnoty námi stanovené u lidí (GPT 1,2 až 32,6j GOT 9,2 až 39,4j) jsou ve shodě s hodnotami uváděnými Wróblevským (GPT až 45j a GOT 5 až 40j).

Chyba metodiky, jak jsme ji stanovili, je poměrně vysoká. Je však vysvětlitelná, uvědomíme-li si faktor času a teploty v průběhu této reakce. Ztížená reprodukovatelnost metody však nehraje roli v její klinické použitelnosti. Změny v aktivitě transamináz u infarktů myokardu a zejména u onemocnění jater, jak je známo z literatury v humánní medicíně i z našich vlastních zkušeností u lidí přesahují značně mez chyby stanovení metody. U lidí s infekční hepatitidou nacházíme běžně aktivitu transamináz 300 až 1000j.

Stanovili jsme normální hodnoty transamináz u koní. Proti hodnotám stanoveným u lidí nacházíme hodnoty u koní GOT téměř desetkrát vyšší a hodnoty GPT přibližně o $\frac{1}{2}$ nižší. V literatuře nám dostupné jsme nenalezli žádnou zmínku o hladině transamináz u koní.

Souhrn

Je podán přehled metod pro určování aktivity transamináz glutamové-oxalacetové a glutamové-pyrohroznové.

Jsou diskutovány výhody a nevýhody stanovení elektroforetického, metody Frankelovy-Reitmanovy, Cabaudovy a Wróblevského. Popsána metoda Wróblevského, stanoveny některé závažné podmínky reakce. Jsou uvedeny normální hodnoty u lidí a u koní. Aktivita transamináz u normálních koní je pro GPT přibližně o polovinu nižší než u člověka (0,7 až 14,9j). Pro GOT je hladina u normálních koní téměř desetkrát vyšší (143 až 268j) než u lidí.

Literatura

1. Cohen P. P., Herkhus G. L.: J. Biol. Chem. 140, 711, 1941. — 2. Karmen A.: J. clin. Invest. 34:131, 1955. — 3. Henley K. S., Pollard H. M.: J. Lab. clin. Med. 46, 785, 155. — 4. Wróblewski F., La Due J. S.: Proc. Exp. Biol. Med. 91, 569, 1956. — 5. Karmen A., Wróblewski F., La Due J. S.: J. clin. Invest. 34, 126, 1955. — 6. Turský T., Bielik E.: Bratislav. lék. listy, 36, II, 404, 1956. — 7. Ševela M.: Scripta medica fac. med. universitatum Brunensis et Olomucensis 29, 185, 1956. — 8. Ševela M.: Čas. lék. čes. 97, 183, 1958. — 9. Cabaud P., Leeper R., Wróblewski F.: Am. J. clin. Pathol. 26, 1101, 1956. — 10. Umbreit W. W., Kingsley G. R., Schaffert R. R., Siple H.: J. Lab. clin. Med. 49, 454, 1957. — 11. Dubach U. C.: Schweiz. Med. Wochschr. 87, 185, 1957. — 12. Wróblewski F., Cabaud R.: Am. J. clin. Pathol. 27, 235, 1957. — 13. Reitman S., Frankel S.: Am. J. clin. Pathol. 28, 56, 1958. — 14. Ševela M.: Vnitř. lék. IV, 8, 721, 1958.

Определение трансаминаз кислот глутаново-оксалукусной и глутаново-пировиноградной в кровяной сыворотке лошадей

Предложен ряд методов определения активности трансаминаз кислот глутаново-оксалукусной и глутаново-пировиноградной. Велась дискуссия о преимуществах и недостатках электрофоретического определения по методу Франкеловой-Райтмановой, Кабаудовой и Вроблевского. Далее описан метод Вроблевского и установлены некоторые основные условия реакции; приводятся также нормальные величины у людей и у лошадей. Активность трансаминаз у здоровых лошадей для ГПТ приблизительно наполовину ниже, чем у человека (от 0,7 до 14,9 е). Для GOT уровень у здоровых лошадей приблизительно в 10 раз выше (от 143 до 268 е).

Die Bestimmung von Transaminase der Glutamin-Oxalessigsäure und der Glutamin-Brenztraubensäure im Blutserum der Pferde

Eine Methodenübersicht der Bestimmung von Transaminasenaktivität der Glutamin-Oxalessigsäure und der Glutamin-Brenztraubensäure wird wiedergegeben. Die Vorteile und Nachteile der elektrophoretischen Bestimmung, der Methode Frankel-Reit-

mann, Cabaud und Wroblewski ist beschrieben und manche wichtige Reaktionsbedingungen werden festgestellt. Normalwerte bei Menschen und bei Pferden sind angeführt. Die Transaminasenaktivität ist bei normalen Pferden für GPT ungefähr um eine Hälfte niedriger als es beim Menschen der Fall ist (0,7 bis 14 Einheiten). Für GOT ist das Niveau bei normalen Pferden fast 10mal höher (143 bis 268 Einheiten) als bei Menschen.

A n m e r k u n g : GOT = Transaminase der Glutamin-Oxalessigsäure,
GPT = Transaminase der Glutamin-Brenztraubensäure.