

SBORNÍK
ČESKOSLOVENSKÉ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

Veterinární medicína

9V

ROČNÍK 5 (XXXIII) – PRAHA, ZÁŘÍ 1960

CENA 10 Kčs

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Řídí redakční rada: akademik Vincenc Jelínek (předseda), gen. MVDr. Vladimír Chládek, člen korespondent SAV František Nižnánský, MVDr. Jiří Boháč, prof. MVDr. Richard Harnach, doc. MVDr. Jaroslav Dražan, prof. MVDr. Karel Šobra, MVDr. Emanuel Král, MVDr. Ladislav Zima, MVDr. Ladislav Polák, MVDr. František Lehký.
Vedoucí redaktor František Němec.

© Československá akademie zemědělských věd, Praha 1960

Obsah - Содержание - Content - Inhalt

- Pokorný B., Lehký F., Šebek Z., Vošta J.: Přírodní ohniska a rezervoáry leptospir v okolí Strakonice a Blatné v r. 1958
Естественные очаги и резервуары лептоспир в окрестностях Страколицы и Блатны в 1958 году
Natürliche Leptospirenherde und Reservoirs in der Umgebung von Strakonitz und Blatná im Jahre 1958 635
- Holec J.: Elektroforéza bílkovin mléčného séra se zřetelem k průkazu původu mléka z prostředí zamořeného tuberkulózu
Электрофорез белков бесказеиновой молочной сыворотки с учетом доказательства происхождения молока из среды, неблагополучной по туберкулезу
Electrophoresis of Milk Serum Albumins with Regard to the Determination of Milk originating from Tuberculous Herds 641
- Vlček Z.: Příspěvek k otázce vztahu bakteriální flóry v pohlavním ústrojí k cystózní degeneraci Graafových folikulů u skotu
К вопросу соотношения между бактериальной флорой в половых органах и кистозной дегенерацией фолликул Графа у крупного рогатого скота
A Contribution to the Question of the Relation of the bacterial Flora of the genital Organs to the cystic Degeneration of the Graaf's Follicles in Cattle 655
- Konrád J.: Aktivita sérové transaminázy kyseliny glutamové oxalocetové, glutamové pyrohroznové a aldolázy při některých hepatopatiích u koní
Активность серозной трансаминазы кислот глутаминовой оксалоуксусной, глутаминовой пировиноградной и альдолазы при некоторых гепатопатиях у лошадей
Die Aktivität der Transaminase der Glutam-Oxalessigsäure, der Glutam-Pyruvaessigsäure und der Aldolase im Serum bei einigen Hepatopathien der Pferde 669

Přírodní ohniska a rezervoáry leptospir v okolí Strakonice a Blatné v r. 1958

Естественные очаги и резервуары лептоспир в окрестностях Страколиц и Блатне в 1958 году

Natürliche Leptospirenherde und Reservoirs in der Umgebung von Strakonice und Blatná im Jahre 1958

Bedřich POKORNÝ, František LEHKÝ, Zdeněk ŠEBEK, Jaroslav VOŠTA
*Státní vědecký veterinární ústav Praha, Veterinární výzkumné středisko Praha,
KHES Jihlava, KHES České Budějovice*

Došlo dne 3. XII. 1959

Úvod

Výzkumy o rozšíření leptospiróz v Československu ukázaly, že s přírodními ohnisky leptospiróz, jmenovitě polních horeček, je nutno počítat nejen už v dříve známých endemických oblastech (jižní Čechy, jihovýchodní a jihozápadní Morava), nýbrž prakticky ve všech krajích našeho státu. Proto jsme se v roce 1958 zaměřili na průzkum některých okrajových částí endemické jihočeské oblasti leptospirózní, a to v okolí Strakonice a Blatné. Toto území se svým geograficko-klimatologickým charakterem, hlavně množstvím povrchových vod, značně podobá již dříve prostudovaným oblastem jihočeským. Již v letech 1940 a 1941 sledovali na Strakonicku Hloucal a Cvrček leptospirovou epidemii, zabývající se hlavně klinickou stránkou onemocnění. Zaznamenali celkem 35 případů blafácké horečky, z nichž 24 patřilo ke katarální, pět k meningeální a šest k nervové formě onemocnění. Poukázali jmenovitě na těžký průběh a vážnou prognózu encefalitid a myelitid této etiologie. Kontrolní sérologické vyšetření bylo provedeno ještě po 3 až 4 letech u 11 případů (Jírovec), z nichž u osmi byly ještě zachovány protilátky ve vysokých titrech.

Vlastní práce

Jako v minulých letech bylo i tu prvním našim úkolem zjištění stupně epidemického a epizootického zamoření populace lidí a zvířat žijících trvale ve sledovaném území. Proto jsme opět nejprve vyšetřovali na přítomnost leptospirózních protilátek krevní séra lidí a zvířat zjevně zdravých nebo stížených takovými chorobami, které vylučovaly podezření z leptospirózy. Krevní séra jsme vyšetřovali metodou mikroaglutinace-lyse s použitím 12 kmenů leptospir, běžně užívaných v diagnostice. Naším domácím kmenům jsme vždy dávali přednost před kmeny standardními.

I. Přehled sérologického vyšetření populace území Strakonice–Blatná v roce 1958

	Lidé	Domácí zvířata				
		koně	skot	berani	kozy	vepři
Počet vyšetření	203	17	142	11	4	17
<i>Leptospira</i>	/	/	/	/	/	/
1. <i>icterohaemorrh.</i>	1	—	—	—	—	—
2. <i>grippotyphosa</i>	—	3	8	—	—	—
3. <i>sejroe</i>	3	—	1	—	—	3
4. <i>pomona</i>	1	—	—	—	—	—
5. <i>australis A</i>	3	—	—	—	—	—
6. <i>bovis</i>	1	—	—	—	—	—
7. <i>mitis</i>	2	—	—	—	—	—
8. <i>ballum</i>	1	—	—	—	—	—
9. <i>bataviae</i>	1	—	—	—	—	—
10. <i>salinem</i>	1	—	—	—	—	—
Celkem	14	3	9	—	—	3

Ze studované oblasti mezi Strakonice a Blatnou jsme celkem vyšetřili 203 krevní vzorky lidí a 191 krevních sér zvířat. Z uvedeného počtu sér lidí jsme zaznamenali reakce s leptospirami ve 14 případech, tj. v 6,9 %. Reakce probíhaly s nejrůznějšími druhy leptospir; nejčastější byly s *L. sejroe* a s *L. australis A* (viz tabulku I). Za pozornost stojí, že jsme tu ani jednou nezjistili reakci s kmeny *L. grippotyphosa*, zato ale třikrát protilátky proti *L. australis A*. Ve většině případů jsme zaznamenali reakce v nejnižších titrech 100 a 200, jimž nepřisuzujeme pozitivní charakter. Skutečně pozitivní nálezy jsme zjistili ve třech případech, a to dvakrát s kmenem *L. sejroe* a jednou s *L. australis A* ve zředění 1 : 800. Zajímavé je také zjištění reakcí, byť i v nízkých titrech, s některými u nás neobvyklými druhy, jako s *L. mitis*, *ballum*, *bataviae* a *salinem*. Z domácích zvířat, převážně ze skotu, jsme vyšetřili celkem 191 krevních vzorků, které pocházely kromě skotu z koní, beranů, koz a vepřů. Z nich jsme zaznamenali reakce v signifikantní hodnotě, tj. od titru 1 : 400 výše, u 15 sér, tj. v 7,8 %. Reakce probíhaly vesměs s kmeny *L. grippotyphosa* a *L. sejroe*, které jsou, jak z dalšího poznáme, hlavními epidemiologickými faktory v tomto území. Pouze

II. Přírodní rezervoáry leptospir Strakonice—Blatná, 1958

Druh zvířete	<i>Neomys fodiens</i>	<i>Sorex araneus</i>	<i>Sorex minutus</i>	<i>Talpa europaea</i>	<i>Mus musculus</i>	<i>Micromys minutus</i>	<i>Apodemus sylvaticus</i>	<i>Clethrionomys glareolus</i>	<i>Microtus arvalis</i>	<i>Pitymys subterraneus</i>	<i>Arvicola terrestris</i>	Celk. počet
Počet	1	25	1	23	15	3	68	28	72	2	1	239
Metoda	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
1. kultivační	—	—	—	—	2	—	3	1	6	—	—	12
2. sérologická	—	2	—	3	2	—	4	1	13	—	—	25
3. histologická	—	—	—	—	2	—	2	1	12	—	—	17

u vepřů uvádíme v tomto počtu i reakce v nižších titrech 100 a 200, které probíhaly vesměs s kmenem *L. sejroae* (viz tabulku I). Je samozřejmé, že jmenovitě v sérech koní, ale i skotu, zaznamenáváme četné koaglutinace. Ve srovnání s dříve studovanými oblastmi jižních Čech, je tedy počet pozitivně reagujících domácích zvířat v prostoru Strakonice a Blatné značně nižší.

V zájmu epidemiologického a epizootologického zhodnocení uvedeného území jsme dále provedli průzkum, zaměřený na vyšetřování rezervoárových zvířat. Za tím účelem jsme podnikli na jaře a na podzim roku 1958 do okolí Strakonice a Blatné dvě terénní expedice, při nichž jsme nabyli do pastí 239 drobných savců, hlavně hlodavců a hmyzožravců, náležejících k 11 zoologickým druhům. Přehled o druhovém složení těchto savců podává tabulka II. Jako v ostatních oblastech stojí i tu mezi ulovenými zvířaty početně na prvním místě hraboš polní (*Microtus arvalis*), těsně za ním pak myšice křovinná (*Apodemus sylvaticus*); tato početná rovnováha obou druhů byla způsobena zejména tím, že hraboš polní byl v jarním období uvedeného roku nepříznivým počasím v časných jarních měsících značně zdecimován a teprve přes léto se jeho stavy poněkud zvýšily. Daleko za ním stojí pak co do počtu ulovených kusů rejsek obecný (*Sorex araneus*) a krtek obecný (*Talpa europaea*). Na rozdíl od typických lokalit jihočeských jsme se tu vůbec nesetkali s hrabošem mokřadním (*Microtus agrestis*).

Ulovené savce jsme vyšetřovali na přítomnost leptospir stejným způsobem jako v předešlých letech, tj. kultivačně, sérologicky a histologicky. Kultivace jsme zakládali v Korthofově půdě a chovali při laboratorní teplotě. Z 239 vyšetřovaných zvířat jsme získali pozitivní kultury ve 12 případech; šest pocházelo z hrabošů polních, tři z myšic křovinných, jedna z norníka rudého a dvě z myši domácích. Nemohli jsme, bohužel, provést u všech těchto kultur druhové určení leptospir, neboť některé vyhynuly dříve, než se mohly pomnožit. U zbývajících jsme provedli typizaci pomocí homologních imunních sér a s přihlédnutím k výsledkům sérologického vyšetření patřičných zvířat jsme prokázali, že v 10 případech šlo o izolaci kmenů *L. grippo-typhosa*, ve dvou případech o *L. sejroae*; oba posledně uvedené kmeny pocházely z myši domácích (*Mus muscu-*

lus). V této oblasti jsme tedy po prvé přímo prokázali přítomnost *L. sejroae*, na jejíž existenci jsme i v ostatních jihočeských ohniscích již poukázali, ale dosud přímo nezachytili.

Sérologickým vyšetřením metodou mikroaglutinace-lyse prováděnou standardním způsobem jsme zjistili z 239 zvířat ze studované oblasti specifické protilátky ve 25 případech, tj. v 10,5 %. Ve 23 případech šlo o reakce s *L. grippotyphosa*, ve dvou případech o protilátky na *L. sejroae* v titrech, které probíhaly v mezích od 1 : 100 do 1 : 12.800. Téměř ve všech případech pozitivních reakcí s *L. grippotyphosa* kromě nejnižších titrů jsme zaznamenali koaglutinace s *L. bovis* v nižším ředění. U jedné myši domácí, z níž byl izolován kmen *L. sejroae*, aglutinovalo sérum jak kmen *L. sejroae* tak *L. grippotyphosa* ve stejně vysokém titru. Reakce s jinými kmeny leptospir jsme u rezervoárových zvířat z této oblasti rovněž nezaznamenali. Kromě druhů savců, které byly pozitivní již metodou kultivační, jsme zjistili pozitivní reakce ještě u dvou rejsků obecných (*Sorex araneus*) a u tří krtků (*Talpa europaea*) s kmeny *L. grippotyphosa*, u jednoho z nich ve vyšším titru 1 : 1600. Avšak u žádného z ulovených krtků jsme leptospiry přímo nenalezli ani při kultivaci, ani při histologickém vyšetření.

Vyšetřením ledvin impregnovaných stříbrem metodou Levaditi-Dobellovou jsme prokázali leptospiry u 17 zvířat, tj. v 7,11 % ulovených savců. Tyto nálezy se plně shodovaly s výsledky předchozích metod (viz tabulku II); naopak jsme nikdy nenalezli leptospiry v koře ledvinné u těch zvířat, která byla předešlými metodami negativní. V některých případech, v nichž jsme zaznamenali pozitivní sérologické reakce, jsme však leptospiry při histologickém vyšetření nezjistili. Mohutné shluky leptospir v *tubuli contorti* jsme nalézali spíše tam, kde sérologické reakce probíhaly v nižších titrech; naopak tam, kde aglutinace leptospir šla do vysokých hodnot (3200, 6400, 12.800), nacházeli jsme v ledvinách jen řídké nebo ojedinělé leptospiry. Lze proto předpokládat mezi těmito nálezy vzájemné vztahy. Nejvíce pozitivních zvířat nám tedy opět odhalila metoda sérologická, nejméně metoda kultivační.

Podobně jako v dříve prostudovaných oblastech jihočeských je i v území v okolí Strakonic a Blatné hlavním rezervoárem leptospir hraboš polní. Kromě toho jsme prokázali nosičství v menší míře i u myšice křovinné a norníka rudého. U těchto druhů jsme zjistili jen nákazu druhem *L. grippotyphosa*, která představuje hlavní patogenní agens i v tomto území. Kromě uvedených zvířecích druhů jsme našli specifické protilátky žňové horečky ještě u rejska obecného a u krtků. Přesto, že jsme měli možnost vyšetřit mnohem větší počet těchto hmyzožravců než z předešlých oblastí, leptospiry jsme u nich nenalezli. Z toho můžeme soudit, že krtěk je sice vnímavý pro patogenní agens jihočeských leptospirózních ohnisek, nákaza se však u něho projeví jen tvorbou protilátek, takže krtěk nemá velmi pravděpodobně význam pro udržování a koloběh leptospir v přírodním ohnisku. Výskyt protilátek na *L. grippotyphosa* je dokladem styku obou uvedených hmyzožravců s polním hrabošem na společném biotopu, kde dochází k předávání patogenního agens. Na rozdíl od ostatních jihočeských ohnisek se nám podařilo prokázat v okolí Strakonic kromě *L. grippotyphosa* ještě existenci *L. sejroae*, a to z přírodního rezervoáru, jímž je tu myš domácí (*Mus musculus*). Lze proto předpokládat, že leptospirózní ohniska jihočeská nebudou zcela monovalentní, jak se původně soudilo. Poukazují na to i signifikantní titry specifických protilátek, které zjišťujeme při vyšetřování krevních sér lidí i domácích zvířat. V našem případě to platilo jmenovitě o reakcích s kmenem *L. australis* A. V poslední době se však podařilo jednomu z nás (Š e b e k) prokázat existenci tohoto kmene v jihlavském kraji izolací šesti kmenů *L. australis* A z ježků východních (*Erinaceus roumanicus*). Lze proto předpokládat existenci tohoto kmene

i v ohniscích právě studovaných. Dokladem toho jsou i výše uvedené výsledky našeho vyšetřování sér lidí, v nichž také zaznamenáváme reakce s kmeny *L. australis* A.

Dokladem epizootologické souvislosti nákazy zvířat se zjištěným patogenním agens může být případ zachycený v obci D. ve strakonickém okrese. Tu jsme v jednom prasečím chlívků nachytali několik kusů myši domácích. Jedna z nich byla všemi metodami zjištěna jako nosič leptospir typu *sejroe*. Proto jsme od tří tu chovaných vepřů vyšetřili krevní vzorky a u jednoho zjistili specifické protilátky na *L. sejroe* v nejnižším titru 1 : 100. Podle sdělení majitele nejevili vepři nijaké známky onemocnění.

Ve studovaném prostoru v okolí Strakonic a Blatné zjišťujeme jako hlavní patogenní agens druhu *L. grippo-typhosa* a *L. sejroe*, které jsme zachytili v čistých kulturách a proti nimž jsme zjistili specifické protilátky v sérech lidí a domácích zvířat. Jmenovitě v sérech zvířat jsme zaznamenali reakce prakticky jen s těmito zjištěnými etiologickými kmeny. Naopak v sérech lidí jsme sice zjistili protilátky na *L. sejroe*, reakce s kmeny *L. grippo-typhosa* jsme však nezaznamenali. Pro tuto skutečnost stejně tak jako pro poměrně malý okruh rezervoárových zvířat, do nichž vyznačuje patogenní agens z hlavních rezervoárů, považujeme studovaný prostor v roce 1958 za leptospirózní ohnisko ve fázi jeho latence. Specifické reakce s kmeny *L. australis* A, které jsme zaznamenali v sérech lidí v hodnotách pozitivního charakteru, lze vysvětlit přítomností i tohoto druhu leptospir, který byl již v Čechách přímo prokázán v ohniscích sousedního kraje.

Souhrn

V roce 1958 studovali autoři přírodní ohniska a rezervoáry leptospir na západním okraji endemické jihočeské oblasti v širším okolí Strakonic a Blatné. Vyšetřili celkem 239 drobných savců na přítomnost leptospir. Kromě *L. grippo-typhosa* zjistili ve studovaném prostoru i *L. sejroe*, které zachytili v čistých kulturách. Specifické protilátky zjistili v krvi 25 zvířat, tj. v 10,5 %; u 17 z nich byly prokázány leptospiry v ledvinách histologickým vyšetřením. Hlavním rezervoárem kmenů *L. grippo-typhosa* je i v tomto prostoru hraboš polní (*Microtus arvalis*), potenciálními nosiči pak myšice křovinná (*Apodemus sylvaticus*) a norčík rudý (*Clethrionomys glareolus*); hlavním rezervoárem *L. sejroe* je tu myš domácí (*Mus musculus*).

Vyšetřováním krevních vzorků domácích zvířat jsme zjistili specifické protilátky v 15 sérech, tj. v 7,8 %, výhradně proti kmenům *L. grippo-typhosa* a *L. sejroe*. Ze 203 krevních vzorků lidí jsme zaznamenali pozitivní reakce v 6,9 %, a to s nejrůznějšími kmeny leptospir, hlavně s *L. sejroe* a *L. australis* A. Na podkladě těchto nálezů charakterizují autoři prostor v okolí Strakonic a Blatné v roce 1958 jako leptospirózní ohnisko v období jeho latence.

*

Ku konci považujeme za milou povinnost poděkovat všem, kteří náš výzkum v uvedeném území podpořili tím, že nám umožnili zpracování materiálu na svých pracovištích nebo nám poskytli jinou technickou pomoc. Jsou to zvláště ředitel OÚNZ ve Strakonicih MUDr. Zdeněk Cvrček, primář interního oddělení Okresní nemocnice ve Strakonicih doc. MUDr. Ludvík Hloucal, ředitel OHES v Blatné MUDr. František Maurer, okresní veterinární lékař v Blatné MVDr. Václav Hudeček a doc. RNDr. Waltr Černý z Biologické fakulty Karlovy university v Praze.

Literatura

1. Hloucal, Cvrček: Leptospirosy na Strakonicku. Prakt. lékař, 24, s. 121, 1944. — 2. Pleško, Kmetý, Bakoss: Výsledky prieskumu prírodného ohniska leptospiróz v oblasti Opavy. Čs. epid. mikrob. imunolog. VII, č. 6, s. 403, 1958. — 3. Pokorný, Lehký, Šebek, Vošta: Přírodní ohniska a rezervoáry leptospir v okolí Vodňan v r. 1957. Sborník CSAZV-Veterin. medicina, roč. 4, č. 2, s. 127, 1959. (Tamtéž viz další literaturu.) — 4. Šebek Z.: Výsledky vyšetřování divoce žijících šelem na leptospirosy. Čs. epid. mikrob. imunolog. VII, č. 5, s. 331, 1958. — 5. Šebek, Vošta: Výsledky sérologického vyšetřování zajíců na leptospiry. Dtto, s. 336. — 6. Šebek Z.: Isolace Leptospira australis A v českých zemích. Čs. epid. mikrob. imunol. (v tisku). — 7. Veselý: Klinická pozorování leptospiros. Čas. léc. čs., č. 38, s. 1441, 1941.

Естественные очаги и резервуары лептоспир в окрестностях Страколиц и Блатне в 1958 году

В 1958 году авторы изучали естественные очаги и резервуары лептоспир на западной окраине эндемической южночешской области в более широких окрестностях Страколиц и Блатне. Авторы исследовали на присутствие лептоспир всего 239 мелких млекопитающих. Кроме *L. grippo-typhosa* в обследуемом пространстве установлены и *L. sejroe*, которые были получены в чистых культурах. Специфические антитела установлены в крови 25 животных, т. е. у 10,5 %; у 17 из них путем гистологического исследования доказано присутствие лептоспир в почках. Главным резервуаром штаммов *L. grippo-typhosa* в этих местах является мышь полевая (*Microtus arvalis*), потенциальным носителем — лесная мышь (*Apodemus sylvaticus*) и полевка рыжая (*Clethrionomys glareolus*); главным резервуаром *L. sejroe* является мышь домашняя (*Mus musculus*).

При исследовании проб крови домашних животных авторы установили специфические антитела в 15 сыворотках, т. е. у 7,8 %, исключительно против штаммов *L. grippo-typhosa* и *L. sejroe*. Из 203 проб крови у людей положительная реакция установлена в 6,9 % случаев, а именно с самыми разнообразными штаммами лептоспир, главным образом с *L. sejroe* и *L. australis* A. На основе этих анализов авторы характеризуют пространство в окрестностях Страколиц и Блатне в 1958 году, как лептоспирозный очаг в периоде его латентности.

Natürliche Leptospirenherde und Reservoirs in der Umgebung von Strakonice und Blatná im Jahre 1958

Im Jahre 1958 studierten die Autoren die natürlichen Leptospirenherde und Leptospirenreservoirs im westlichen Teile des endemischen südböhmischen Leptospirengebietes und zwar in der Umgebung von Strakonice und Blatná. Insgesamt wurden 239 Kleinsäugetiere leptospirologisch untersucht. Außer *L. grippo-typhosa*-Stämmen wurden auch *L. sejroe*-Stämme in Reinkulturen gezüchtet. Spezifische Antikörper wurden im Blute von 25 Tieren d. i. 10,5 % festgestellt, bei 17 davon wurden die Leptospiren in den Nieren histologisch nachgewiesen. Das Hauptreservoir von *L. grippo-typhosa* ist auch in diesem Gebiete die Feldmaus (*Microtus arvalis*), Potentialträger sind auch die Waldmaus (*Apodemus sylvaticus*) und Röteldmaus (*Clethrionomys glareolus*); Hauptreservoir von *L. sejroe* ist die Hausmaus (*Mus musculus*).

Bei der serologischen Untersuchung der Haustiere wurden die spezifischen Antikörper in 15 Seren, d. i. 7,8 %, festgestellt. Alle Sera reagierten ausschließlich *L. grippo-typhosa* oder *L. sejroe*. Von 203 Menschenseren reagierten 6,9 % und zwar mit verschiedenen Stämmen, hauptsächlich mit *L. sejroe* und *L. australis* A. Auf Grund dieser Befunde bezeichnen die Autoren das Gebiet in der Umgebung von Strakonice und Blatná im Jahre 1958 als einen latenten Leptospirenherd.

Elektroforéza bílkovin mléčného séra se zřetelem k průkazu původu mléka z prostředí zamořeného tuberkulózou

Электрофорез белков бесказеиновой молочной сыворотки с учетом доказательства происхождения молока из среды, неблагополучной по туберкулезу

**Electrophoresis of Milk Serum Albumins with Regard to the Determination of Milk
originating from Tuberculous Herds**

MVDr. Josef HOLEC

*Ustav pro hygienu a technologii potravin Veterinární fakulty VŠZL v Brně,
přednosta doc. MVDr. et RNDr. Miroslav Dobeš*

Došlo dne 1. X. 1959

Úvod

Bílkovinám mléka je věnována všestranná pozornost jednak pro jejich průmyslové využití, jednak pro jejich výživnou a dietetickou hodnotu. Proto byly bílkoviny mléčného séra již dávno zkoumány chemicky. Fyzikálně-chemických metod bylo použito až později. Na bílkoviny mléka nebyly fyzikálně-chemické metody dlouho aplikovány, ačkoliv tato praxe byla již vyzkoušena především na bílkovinách krevního séra (G r a s s m a n n).

G á l (9) uvádí S m i t h a jako prvního, který již v roce 1946 prováděl elektroforézu mléka a zabýval se zejména bílkovinami, které jsou nositeli imunní aktivity. Smith určil, že bílkovinné spektrum mléka se skládá z těchto bílkovin: euglobulinu a pseudoglobulinu (imunní globuliny), Palmerova β -laktoglobulinu a tří nepojmenovaných, blíže neurčených složek.

Základní práce pro papírovou elektroforézu mléka provedli v roce 1955 S c h u l t e a M ü l l e r (21), kteří z odstředěného mléka získali sedm bílkovinných frakcí. Ze syrovátky, připravené z téhož mléka za pomoci kyseliny šťavelové, získali osm frakcí barvitelných ninhydrinem. Ke sjednocení v označování frakcí dělitelných elektroforeticky, jak u mléka, tak u syrovátky použili označování římskými číslicemi I až VIII, při čemž komponenta I putuje nejdále anodicky, komponenta VIII zůstává na nanášecím místě. Stejně označování jednotlivých frakcí používá B e r g m a n n (2) a S c h u s t e r (22).

Jiní autoři, mezi nimi např. S u m c o v (20), označují frakce rovněž římskými číslicemi, ale v opačném smyslu, takže komponenta zůstávající na místě nese označení I, komponenta nejrychlejší má číslo nejvyšší. S u m c o v (20) neuvádí proč používá tohoto označení frakcí, patrně však proto, že prakticky provádíme identifikaci frakcí od místa nanesení směrem anodickým.

Kutáček a Kratochvíl (14) přidržují se při označování frakcí písmen velké abecedy, což však při přepisu např. do ruské verze způsobuje komplikace. Vandegaer a Miettinen (23) označují bílkovinné frakce mléka malými písmeny. Je však možno najít i jiná označení, která více nebo méně vystihují chemické označení frakcí [Biserte, Breton a Fontaine (3)].

Biserte, Breton a Fontaine (3) kteří mimo jiné velmi podrobně studovali bílkoviny mléka, shledali, že klasická frakce označovaná „lactalbumin“, kterou moderní biochemie rozložila na α -laktoglobulin, β -laktoglobulin a serumalbumin, je při elektroforetické analýze, vedle těchto tří základních součástí, obohacena ještě o další dvě frakce, z nichž jednu Schulte a Müller (21) považují za vycestovanou z β -laktoglobulinu označovaného IV. Vycestovanou složku označují III. A-laktalbumin je podle Biserte a spol. (3) elektroforeticky homogenní. Imunní globuliny, klasicky označované „lactoglobulin“, dělí se biochemicky na euglobuliny a pseudoglobuliny podle toho, zda jsou anebo nejsou rozpustné ve vodě. V literatuře jsme našli žádnou zprávu, která by ukazovala, že při elektroforéze by se tyto imunní globuliny projevíly jinak nežli jako dvě frakce. Naopak lze tedy předpokládat, že toto jsou dvě samostatné, elektroforeticky homogenní, na elektroforeogramu mléčného séra bezpečně určitelné frakce, které za některých stavů a procesů v organismu, např. při tuberkulózním zánětu mléčné žlázy, jak zjistil Schuster (22), se mohou ve většině případů dokonale překrývat, takže pak zdánlivě splývají ve frakci jedinou. Frakce imunních globulinů označují Schulte a Müller (21) číslicemi VII a VI.

Na elektroforeogramech mléčného séra zjišťujeme ještě další frakci, která neodpovídá žádné z dosud známých bílkovin mléka. Tato frakce se zjišťuje v místě nanesení a různí autoři mají na její charakter různý názor. Schulte a Müller (21) považují tuto frakci za bílkovinu adsorptivně vázanou na papíře, o níž nic bližšího neříkají. Schuster (22) naproti tomu soudí, že jde o mléčný cukr. Sumcov (20) považuje tuto frakci za skvrnu sestávající z γ -kaseinu, který se při pH 8,4 v elektrickém poli nepohybuje, a z lipoproteidů kuliček mléčného tuku, a to proto že tato frakce je barvitelná jak bromfenolovou modří, tak i alkoholickým roztokem sudanu III, tj. indikátorem na lipidy.

Pokud se týče relativního zastoupení jednotlivých frakcí v elektroforeogramu je třeba především pamatovat, že údaje získané volnou elektroforézou nejsou totožné s údaji získanými elektroforézou na papíře. Příčiny těchto diferencí probírá Filip (8) a uvádí, že ani zavedení přepočítávacích faktorů nemůže sjednotit výsledky volné a papírové elektroforézy, nýbrž že je třeba metody standardizovat, u každé práce uvádět přesnou metodiku a podmínky, za nichž bylo výsledků dosaženo, a takto určit tzv. normální hodnoty, Oppelt (16). Z uvedeného vyplývají snahy po sjednocení metodik papírové elektroforézy.

Pouze pro úplnost uvádíme, že Smith (19) rozdělil sérum připravené z mléka okyselením do isoelektrického bodu kaseinu, tj. na pH 4,65, neutralizované louhem a dialyzované proti nárazníkovému roztoku o pH 8,65 a iontové síle $\mu = 0,1$, na šest frakcí, z nichž imunní globuliny představují 10 rel. % a β -laktoglobulin 48 rel. %. Dále ve své práci zjistil, že průběhem hyperimunitace krav mohou, ale nemusí vždy imunní složky vzrůstat.

Velmi podrobně studovali obsah jednotlivých frakcí v syrovátce získané z mléka okyselením kyselinou šťavelovou, při Na-veronal nárazníku o pH 7,9, $\mu = 0,1$, za teploty $20^{\circ}C$, Schulte a Müller (21). Detekci prováděli ninhydrinem, vyhodnocení přímou fotometrií a srovnáním ploch ohraničených Gaussovými křivkami. Frakce sledovali po celou laktaci, při čemž zjistili, že asi sedmého dne po porodu dochází k jejich stabilizaci, při čemž se sníží množ-

ství imunních globulinů z původních 57 na 27 rel. %, které teprve potom se elektroforeticky dělí na dvě samostatné frakce.

Bergmann (2) za obdobných podmínek provedl frakcionaci bílkovin na papíře, a to z mléčného séra dojnic zdravých a dojnic nemocných tuberkulózou vemene, při čemž zjistil tyto průměrné a mezní hodnoty:

Mléčné sérum dojnic	Označení frakcí						
	III.	IV.	V.	VI.	VII.	VIII.	VI.+VII.
Zdravých	3 2-4	48 37-56	17 11-23	17 13-21	13 9-20	2 1-4	30 24-37
S TBC vemene	— —	11,5 2-20	12,8 3-21	68,60 58-94		7,1 0-14	

Bergmann (2) na podkladě dosažených výsledků zastává názor, že papírová elektroforéza po odpovídajícím rozpracování metodiky otevře cestu k diagnostice TBC mléčné žlázy na základě vyšetření mléka. U sekretu z tuberkulózně zánícené mléčné žlázy izoloval o jednu frakci méně (chybí frakce III) a v 75 % vyšetření nebylo možno provést rozdělení imunních globulinů.

Stejných výsledků dosáhl Schuster (22) a konstatuje, že při TBC mléčné žlázy dochází ke zřetelnému zvýšení frakcí nesoucích imunní globuliny na účet frakcí komplexu β -laktoglobulinu.

Kutáček a Kratochvíl (14) zjistili papírovou elektroforézou relativní rozložení frakcí v séru mléčném u dojnic brucelózních, které ve srovnání s frakcemi bílkovin zdravých dojnic jsou poněkud obohaceny ve frakci imunních globulinů, což potvrzují statistickým počtem. Zvýšení obsahu imunních bílkovin je provázáno úměrným zmenšením frakcí β -laktoglobulinu.

Metodika

Papírovou elektroforézu jsme prováděli ve vlhké komůrce postavené podle vlastního návrhu.

Jako zdroj stejnosměrného napětí jsme amatérsky zhotovili usměrňovač elektrického proudu se stabilizátorem napětí s přepínačem na 220 a 320 V s možností plynulé regulace od 100 do 360 V s maximálním zatížením 100 mA.

Vzorky mléka k vyšetřování jsme odebírali v laboratořích mlékařských závodů nebo přímo v zemědělských závodech. Vždy jsme však ve spolupráci se státní veterinární službou zjišťovali, zda odebraný vzorek mléka pochází ze závodu zamořeného tuberkulózou, brucelózou nebo jinými závažnými chorobami s přihlédnutím k výživnému stavu. Takto jsme tedy získali vzorky mléka ze závodů prostých tuberkulózy a brucelózy, ale i ze závodů totálně zamořených tuberkulózou, kde všechny dojnice kladně reagovaly na tuberkulín. Takto byly získány vzorky z JZD, ČSSS, soukromých zemědělských závodů a od záhumnkových dojnic družstevníků. Celkový průřez spektrem bílkovin mléčného séra jsme se pokusili získat rozbořem tzv. cisternových vzorků, tj. vzorků z cisternových vozů o obsahu cisterny 3000 l, které svázejí mléko z nasávací oblasti. Opakovaným rozbořem zejména vzorků cisternových jsme si ověřovali reproduktivnost výsledků.

U vzorků šlo vždy o směs mléka pocházející z polední a večerní dýje dne předchozího a z ranní dýje téhož dne, kdy jsme vzorek odebrali. V žádném případě nebylo ve vzorku mléko starší 24 hodin. Zpravidla v den odběru jsme vzorky zpracovali, nebo alespoň jsme připravili mléčné sérum, které po uložení v lednici bylo zpracováno nejpozději další den.

Mléčné sérum jsme připravovali tak, že k 5 ml dobře odstředěného mléka (2×20 min./3000 ot./min.) jsme přidali 0,5 ml syřidla (naředěného na sýřící mohutnost 1 : 1000) a po protřepání jsme vzorek zahřívali na vodní lázni na teplotu 30°C po 20 minut. Za tuto dobu byl u převážné většiny vzorků kasein dobře vysrážen. Mírným odstředěním (2500 ot./min. po 5 až 10 minut) jsme ve většině případů získali v supernatantu čistou syrovátku, kterou jsme použili k elektroforetickému rozdělování.

Elektroforézu bílkovin syrovátky jsme prováděli nanesením připraveného vzorku na chromatografický papír Whatman No 1 o rozměru 300×33 mm. Vzorek o velikosti 60 mm^3 jsme nanášeli na proužek papíru nasáknutý ústojným roztokem, v němž byl přebytečný roztok odstraněn stlačením mezi dvěma filtračními papíry. Nanášení vzorků jsme si velmi ulehčili a urychlili tím, že jsme potřebné množství odměřili z mikropipety a vzorek jsme nanесли na vhodně uzpůsobenou plošku nanášecí stoličky, odkud jsme nechali vzorek vsáknout v podobě čáry do papíru, a to 10 cm od katodického konce, přičně na podélnou osu papírového proužku.

K rozdělování jsme používali ústojný roztok doporučený I z á k e m (12) o tomto složení: 22,22 g Na-diethylbarbituricum se rozpustí ve 2000 ml H_2O redest., k němuž se přidá roztok veronalu (15 g veronalu v 500 ml vařící redest. vody) až je pH 8,6 až 8,8. Při přípravě nárazníku jsme zpravidla spotřebovali 75 až 80 ml koncentrovaného roztoku veronalu k posunutí pH na 8,6, čímž náš připravovaný pufr měl iontovou sílu přibližně $0,1\ \mu$.

Poněvadž izoelektrický bod bílkovin obsažených v syrovátce je kolem pH 5, putují za použití našeho (alkalického) nárazníku všechny frakce směrem k anodě.

Rozdělování bílkovin mléčného séra jsme prováděli při teplotě laboratoře (20°C), stejnosměrným stabilizovaným proudem o napětí 260 V, po čtyři a půl hodiny při čemž procházející proud dosáhl intenzity $0,8\text{ mA}/1\text{ cm}$. Za těchto podmínek bylo bílkovinné spektrum rozloženo asi na 8 až 10 cm, čímž došlo k dostatečnému rozdělení jednotlivých frakcí. Pak byly bílkoviny na celulózu fixovány sušením při 105°C po deset minut. Defekce byla prováděna barvením 0,5 % roztokem bromfenolové modři v metanolu nasyceném sublimátem (20 min.), s následným propíráním v mírně tekoucí vodě až do odbarvení papíru.

Kvantitativní vyhodnocení jednotlivých frakcí bylo prováděno po rozdělení elektroforeogramu v minimech. Frakce byly eluovány v 5 ml 8 % roztoku bezvodého uhlíčitánu sodného v 50 % metanolu, po 40 minut, za občasného třepání. Na Pulfrichově fotokolorimetru byla změřena extinkce eluátu v semimikrokyvetách při filtru S 57 a kvantita jednotlivých frakcí byla vypočtena v relativních procentech.

Vlastní výsledky

Vzali jsme si za úkol sledovat bílkoviny mléčného séra při tuberkulóze prokazatelné alergicky se zaměřením na hygienu mléka. Ke splnění tohoto úkolu jsme vyšetřovali elektroforeticky vzorky mléka od dojníc, které nereagovaly, a od dojnic, které reagovaly kladně na tuberkulín. Z hlediska hygieny zajímalo nás

bílkovinné spektrum mléka tak, jak toto přichází ze zemědělských závodů do mlékáren, tj. zajímali jsme se především o vzorky hromadné. Pro srovnání z hlediska biochemie nemohli jsme ovšem opominout stejným způsobem vyšetřit vzorky mléka od jednotlivých nereagujících a od jednotlivých alergicky nemocných dojnic, a to opět ve stavu jak mléko těchto dojnic přichází do mlékáren.

Způsobem přesně popsáním v metodice se nám dařilo rozdělit směs ve vodě rozpustných bílkovin mléčného séra, ve stejnosměrném elektrickém poli na čtyři až šest, někdy i na sedm frakcí. Při jejich identifikaci jsme pracovali podle literatury, která uvádí lokalizaci a relativní zastoupení jednotlivých frakcí na elektroforeogramu. Tímto způsobem jsme frakce přesně identifikovali. Při jejich označování přidržujeme se Schultza a Müllera (21).

Jednotlivé soubory vzorků mléka byly charakterizovány co do počtu frakcí a jejich relativní velikosti takto:

Frakce VIII, jejíž význam se dosud nezdá být zcela objasněn, je představována podle našich pozorování (aniž však jsme se složením této frakce zabývali) pravděpodobně mléčným cukrem, který při fixaci elektroforeogramu teplem, na napíře poněkud tmavne a projeví se světle žlutavým zabarvením. Zůstává na nanášecím místě nebo se posune celkem nepatrně k anodě. Totéž místo, někdy jen jeho anodický okraj, se projeví barvením na bílkoviny. Lze tedy tuto frakci považovat za nehomogenní, obsahující cukr i bílkoviny. Kvantita této frakce se u souborů našich vzorků pohybovala průměrně od 3,2 do 7 rel. %. Podle těžko vysvětlitelného kolísání lze připustit domněnku o adsorptivní vazbě bílkoviny na chromatografický papír.

Frakce VII a VI jsou nositelé imunních globulinů. Pomalejší frakce VII byla obsahově asi o jednu třetinu až o jednu polovinu menší než frakce VI. Obě tyto frakce se však nerozdělují stejně zřetelně u všech vzorků. U vzorků od jednotlivých nereagujících dojnic se rozdělují lépe a ostřeji. U hromadných vzorků je vzájemná oddělitelnost těchto frakcí zhoršena, takže minimum mezi frakcemi je málo zřetelné. U hromadných vzorků se někdy dokonce nedá nalézt hranice mezi těmito frakcemi, takže dochází k jejich vzájemnému překrývání. U mlék od tuberkulín-pozitivních dojnic je zhoršená dělitelnost obou frakcí častějším úkazem, a to zejména u mlék, jejichž obsah imunních globulinů je vysoký. Poněvadž obě frakce mají biochemicky stejný význam, hodnotíme jejich obsah co do zvýšení hladiny úhrnně přesto, že při vyhodnocování elektroforeogramů, pokud je to možné, je registrujeme samostatně. Obsah imunních globulinů u mlék od dojnic nereagujících kolísá v rozmezí 18 až 30 rel. %, u mlék od dojnic reagujících v rozmezí 30 až 57 rel. %.

Frakce V, IV a III vytvářejí komplex β -laktoglobulinu, který představuje klasickou frakci lactalbumin. Samotná frakce V je nejpomalejší z tohoto komplexu a v našich rozborech kolísala od 18 do 22 rel. %. Na základě hodnocení všech souborů vzorků je obsah této frakce vzhledem k ostatním frakcím tohoto komplexu dosti stabilní. Hlavní součástí komplexu je frakce IV. Představuje β -laktoglobulin a podílí se u mlék od nereagujících dojnic průměrně asi 46 % na spektru bílkovin mléčného séra. U mlék od kladně reagujících dojnic se obsah této frakce snižuje na 35 až 40 rel. %.

Nejrychlejší frakce tohoto komplexu, frakce III, považuje se za frakci vycestovanou z β -laktoglobulinu. Její obsah je velmi nízký, činí pouze několik procent a je vydělitelná zpravidla u mlék od jednotlivých nereagujících dojnic. U mléka dojnic tuberkulín-pozitivních vyděluje se méně často, u hromadných vzorků jsme tuto frakci nezjistili vůbec.

Vzácně měli jsme příležitost pozorovat rozdělení komplexu β -laktoglobulinu na více než tři frakce.

I. Přehled o kvantitě frakcí u jednotlivých souborů analýz

Označení	Jednotlivé frakce						Imun. globulíny		Albumino- globulinový kvotient
	VIII.	VII.	VI.	V.	IV.	III.	celkem	směrodatná odchylka	
Mléko od dojníc nereagujících na tuberkulín (vyznačeno v diag. I) Vzorky od jednotlivých dojníc (soubor 15. vzorků)									
Průměr	4	8,6 25,0	16,4	20	48	4	25,0	2,42	3,4
Variační šíře	0—9	6—12 19—30	13—20	4—28	39—64	0—13	19—30	—	2,21—4,05
Mléko od dojníc nereagujících na tuberkulín (vyznačeno v diag. II) Vzorky od malých skupin dojníc (soubor 15 vzorků)									
Průměr	4,5	10,1 25,1	15,0	20,3	46	4	25,1	5,13	2,80
Variační šíře	0—11	5—14 18—30	9—22	16—29	41—53	0—8	18—30	—	2,14—4,00
Vzorky mléka z cisternového svozu (vyznačeno v diag. III) Vzorky od velkých skupin dojníc (soubor 20 vzorků)									
Průměr	7,4	23,2	23,3	46,2	—	23,2	5,58	3,19	
Variační šíře	3—19	13—28	17—30	38—57	—	13—28	—	2,19—6,24	

Mléko od dojnic reagujících pozitivně na tuberkulín
Vzorky od jednotlivých dojnic (soubor 15 vzorků)
A. od dojnic dobrého výživného stavu (vyznačeno v diag. IVA)

Průměr	4,2	20,5 18,7 39,2	16,9	39,7	—	39,2		
Variační šíře	2—7	18—21 12—29 30—50	12—25	34—45		30—50		

B. od dojnic špatného výživného stavu (vyznačeno v diag. IVB)

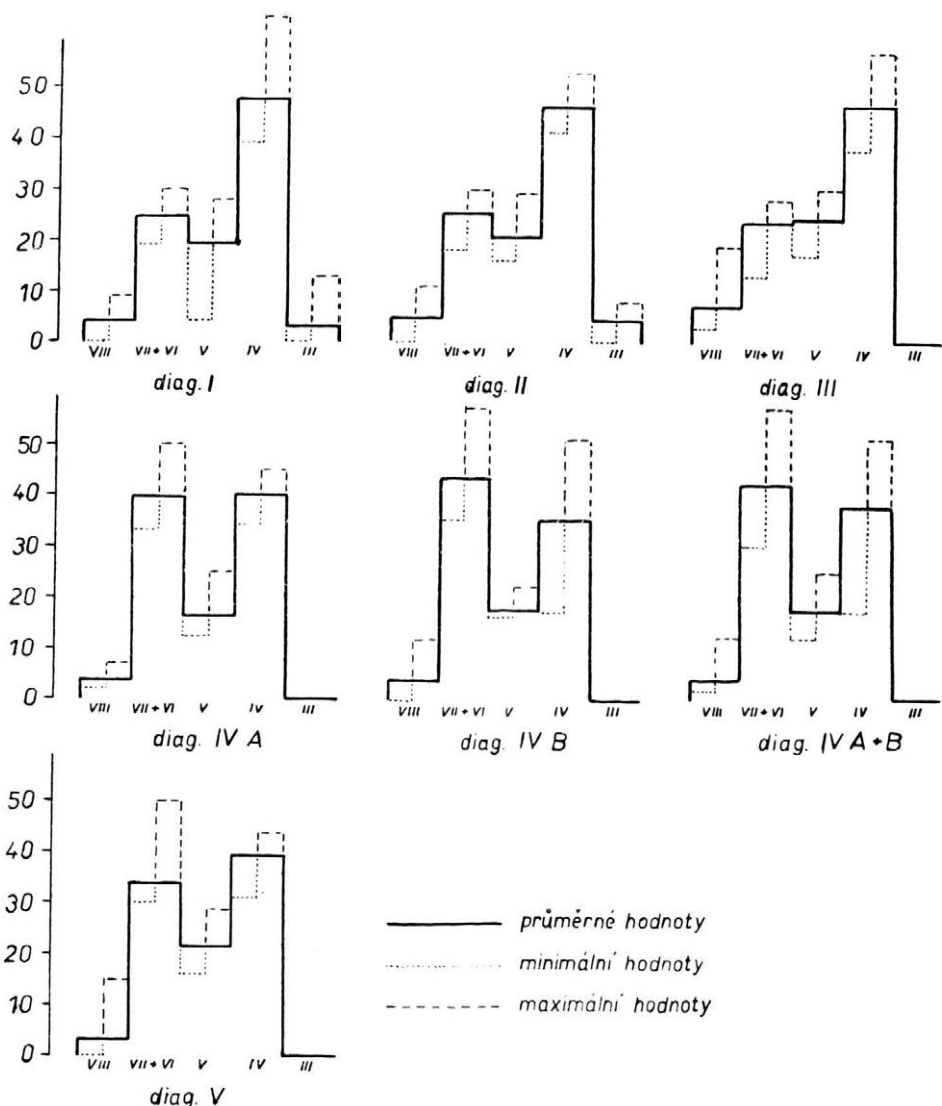
Průměr	4,0	43,1	17,8	35,1	—	43,1		
Variační šíře	0—12	35—57	16—22	17—51	—	35—57		

A. + B. od dojnic celého souboru (vyznačeno v diag. IVA + B)

Průměr	4,1	42,0	17,3	37,5	—	42,0	14,5	1,38
Variační šíře	2—12	30—57	12—25	17—51	—	30—57	—	0,70—2,22

Mléko od dojnic reagujících pozitivně na tuberkulín (vznač. v diag. V) — Vzorky od malých skupin dojnic (soubor 37 vzorků)

Průměr	3,2	14,0 20,0 34,0	22,0	40,0	—	34,0	4,25	1,86
Variační šíře	0—15	9—21 14—29 30—50	16—29	31—44	—	30—50	—	0,96—2,20



Obr. 1. Přehled o kvantitě bílkovinných frakcí u jednotlivých souborů analýz

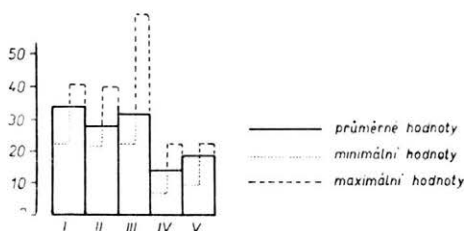
Pro úplnost uvádíme, že ke spektru bílkovin mléčného séra náleží ještě frakce II a I, které detekcí bromfenolovou modří nelze zjistit. Lze je zjistit pouze barvením ninhydrinem. Obě tyto nejrychlejší komponenty mají podobné vlastnosti a vyskytuje se názor, že vznikají sekundárně při přípravě mléčného séra, a to z kaseinu. Ve vztahu k naší práci nelze je tedy hodnotit, a proto jsme nepoužili detekčních metod na jejich zjištění.

Přehled o průměrné velikosti jednotlivých frakcí a o její variační šíři v pěti různých souborech vzorků podává tabulka I. Náznorně jsou tyto poměry vyznačeny v diagramech I, II, III, IVA, IVB, IVA+B a V (obr. 1). V diagramech vyznačené maximální a minimální hodnoty jednotlivých souborů analýz dávají představu o souměrnosti rozložení hodnot kolem aritmetického středu (obr. 1).

V tabulce I je zvlášť uváděna celková hodnota imunních globulinů, dále směrodatná odchylka v jejich kvantitě, počítaná podle $\sigma = \pm \sqrt{\frac{x^2 - n \bar{x}^2}{n - 1}}$.

Konečně jako třetí charakterizující hodnotu vypočítáváme poměr albuminu a globulinů tzv. albuminoglobulinový kvotient. Vynesením A/G kvotientu do grafu vystává zřetelně rozdílnost ve složení mléka od dojnic nereagujících a od dojnic reagujících pozitivně na tuberkulín (obr. 2). Vynesené maximální a minimální hodnoty naznačují, že jde vesměs o významné rozdíly.

K ověření správnosti použité metody určili jsme rozptyl hodnot jednotlivých frakcí bílkovin mléčného séra při dvojím stanovení. Dvě třetiny počtu analýz byly provedeny paralelně, jedna třetina opakovaných analýz byla provedena druhý nejdéle však třetí den po opatření vzorku. Analýzy provedené opožděně, tj. druhý nebo třetí den, při čemž mléčné sérum bylo uloženo v ledničce, nevykazovaly rozdíl dvou stanovení větší nežli u analýz provedených souběžně. Přehled o rozptylu hodnot jednotlivých frakcí podává tabulka II.



Obr. 2. A/G kvotient jednotlivých souborů analýz

II. Přehled o rozptylu hodnot jednotlivých frakcí při paralelním nebo v krátkém intervalu opakovaném stanovení (soubor 12 analýz)

Označení	VIII.	VII.+VI.	V.	IV.	III.
Průměr součtu rozdílů při dvojím stanovení	2,25	2,08	2,92	2,93	—
Maximální rozdíl v relat. %	5	6	7	7	—
Minimální rozdíl v relat. %	0	0	1	0	—

K ověření postačitelnosti jednorázové analýzy zkoumaných vzorků bílkovin mléčného séra sledovali jsme reproduktivnost výsledků při opakovaném rozboru opětovně odebraného téhož vzorku po jedno- až dvoutýdenním intervalu. Přehled podává tabulka III.

III. Reproductivnost hodnot jednotlivých frakcí při rozboru opakovaném za 7 až 14 dnů (soubor šesti analýz)

Označení	VIII.	VII.+VI.	V.	IV.	III.
Průměr součtu rozdílů při opakovaném stanovení za 7 až 14 dnů	5,0	3,28	3,5	6,9	—
Maximální rozdíl v relat. %	17	6	8	15	—
Minimální rozdíl v relat. %	0	1	0	1	—

Diskuse a hodnocení výsledků

V tabulce I uvedené výsledky ukazují, že mléko od dojnic reagujících pozitivně na tuberkulín má poněkud odlišné složení bílkovin mléčného séra. Proti normálnímu složení bílkovinného spektra, za které považujeme z hlediska hygieny mléko od zdravých dojnic nereagujících na tuberkulín, jde o zvýšení hladiny imunních globulinů, a to v průměru o 10 rel. %, srovnáváme-li navzájem průměry mlék od nereagujících a od tuberkulín-pozitivních dojnic. Zvýšení hladiny imunních globulinů u mlék od jednotlivých pozitivně reagujících dojnic představuje v průměru 18 rel. %. Nejde tedy v našich případech při tuberkulóze zjišťované alergicky o elektroforetický průkaz nějaké nové nebo specifické bílkoviny, ale zjišťujeme pouze zvýšení hladiny imunních globulinů, a to na úkor komplexu β -laktoglobulinu.

I když v našem případě nejde o specifický průkaz tuberkulózy, máme za to, že v některých, a to především ve sporných případech je elektroforéza mléka na papíře použitelná pro průkaz původu mléka ze zamořené stáje. V tomto případě však jako zamořená stáj přichází v úvahu především stáj izolační nebo stáje s vysokým stupněm zamořenosti. Je samozřejmé, že zmnožení imunních globulinů v mléce může nastat u dojnic také při jiné infekci s antigenně působícími zárodky. Tak např. K u t á č e k a K r a t o c h v í l (14) zjistili zvýšení imunních globulinů u brucelózních dojnic, a to v průměru o 3,9 %. S c h u s t e r (22) zjistil u mléka pocházejícího z prokázaně tuberkulózního vemene enormní zvýšení imunních globulinů, a to o 28 až 64 %.

Údaje o vztahu bílkovinného séra mléka k jiným infekčním nebo invazijním chorobám dojnic jsme nenašli.

Předpokládáme-li však korelaci mezi zmnožením γ -globulinů krevního séra a zmnožením imunních globulinů v mléce, můžeme očekávat zvýšení imunních globulinů v mléčném séru především u chorob jaterních. K předpokladu pozitivní korelace nás opravňují následující práce: B o d a a K o ň a (4) zjistili u tuberkulózy a některých jaterních chorob u skotu zvýšení γ -globulinů. Podobně H o j o v c o v á (10) zjistila zvýšení γ -globulinů nebo i jiných globulinových frakcí u krevních sér tuberkulózního skotu. Zajímavé ovšem je, že u skotu nemocného alergickou tuberkulózou nenašla vždy zvýšení globulinových frakcí, což souhlasí s našimi nálezy na bílkovnách mléčného séra u některých dojnic pozitivně reagujících na tuberkulín. Podobný zásadní výsledek získal B e n e š (1), který u brucelózního skotu zjistil zvýšení γ -globulinů v séru krevním, K u t á č e k a K r a t o c h v í l (14) v séru mléčném. Z uvedeného tedy vyplývá, že při tuberkulóze a brucelóze dochází ke zvýšení imunních globulinů v krvi i v mléce dojnic.

Z ostatních chorob budou to především onemocnění mléčné žlázy, která mohou mít velmi výrazný vliv na bílkovinné spektrum mléka. R e n k (17) stanovil chemicky hlavní bílkoviny a vypočetl A/G kvotient, jehož hodnota u mléka z vemene vylučujícího Bangovy zárodky je ve srovnání s mlékem ze zdravého vemene téměř o polovinu menší. To znamená, že rovněž došlo ke zvýšení imunních globulinů, které autor ještě zjistil, z hlediska klinického u některých dalších druhů zánětů mléčné žlázy.

M i d d l e b r o o k a D u b o s (15) zjistili při tuberkulóze lidí v séru krevním haemaglutin a haemolysin, které za určitých podmínek mohou být měřítkem pro aktivitu nebo rozšíření tuberkulózních afekcí. B e r g m a n n (2) referuje o korelaci mezi výškou haemaglutinačního titru a hladinou imunních globulinů mléka dojnic s tuberkulózním zánětem vemene. J e r m o l a j e v (13) zjišťoval arboceptor v mléce tuberkulózních dojnic a zjistil, že pozitivní vazba

komplementu s mléčným sérem poukazuje buď na čerstvou tuberkulózu vemene nebo na nevyhojená tuberkulózní ložiska v ostatním organismu dojníc. Lze usuzovat na základě těchto prací, že elektroforéza mléčných bílkovin dojníc by za určitých podmínek mohla přispět k posouzení dynamiky tuberkulózního procesu.

Variační šíře a zejména vypočtené střední odchylky pro kvantitu imunních globulinů, které hovoří o těsnosti sepětí hodnot vyšetřovaného souboru kolem průměrné hodnoty mohou být charakteristikem pro taková posuzování.

Vedle různých onemocnění dojníc může ovlivnit hodnotu imunních globulinů v mléčném séru především kolostrum, které teprve sedmý den po porodu stabilizuje hodnotu imunních bílkovin na hodnotě mléka normálního [Schulte a Müller (21)].

Chceme-li však z hlediska hygieny mléka nalézt hranici u mlék z nezašlehaného prostředí a mlék od tuberkulín-pozitivních dojníc, tedy z prostředí zašlehaného, zjišťujeme, že samotná kvantita imunních globulinů nám nepostačuje zejména v těch případech, kde variační šíře se u dvou souborů dotýká nebo i překrývá. Vypočtená střední odchylka nám poněkud stírá maximum a minimum variační šíře, ale u mlék od dojníc tuberkulín-pozitivních, tady tam, kde kvantita imunních globulinů může značně kolísat, zasahuje až do oblasti variační šíře mlék nereagujících dojníc. I když u hromadných vzorků mléka od tuberkulín-pozitivních dojníc nastává určité vyrovnání maximálních a minimálních hodnot tím, že vzorek takového mléka se blíží jakémusi průměrnému vzorku jiné kvality, přece směrodatná odchylka zasahuje na hranici variační šíře hodnot pro mléko od dojníc nereagujících.

Z našich výsledků je zřejmo, že změny na bílkovinném spektru mléka nejlépe postihuje poměr albuminů (komplex β -laktoglobulinu) a globulinů (imunních globulinů), tzv. albuminoglobulinový kvotient (A/G kvotient), jehož normální hodnota, kterou jsme vypočetli na podkladě elektroforetického rozdělení bílkovin mléčného séra, téměř souhlasí s hodnotou, kterou vypočetl Renk (17) na podkladě chemického rozboru mléka. Srovnáme-li průměrné hodnoty A/G kvotientu pro mléka od tuberkulín-pozitivních dojníc s průměrnými hodnotami mlék dojníc nereagujících zjistíme, že se tyto hodnoty výrazně liší. Stejně tak srovnáním variační šíře těchto kvotientů zjišťujeme nepatrné překrývání v rozsahu 3/100 kvotientu, tj. 0,009 % jeho hodnoty. Diferenci normálních hodnot našich a Renkových stanovení, která představuje 3/10 kvotientu, tj. 0,92 % jeho hodnoty, vysvětlujeme použitím velmi různých analytických metod, které nelze srovnávat. Dokonce autoři, kteří se zabývali použitím papírové elektroforézy k analýze bílkovin např. Chopard (11), Boguth (5), Zicha a spol. (21), uvádějí, že fyziologické normy nebo normální hodnoty pro srovnání s hodnotami sledovanými si musí vytvořit každé pracoviště, a to naprosto shodnou metodikou. Na podkladě těchto prací přisuzujeme hodnotám, které jsme získali, platnost relativní a hodnotíme je pouze ve srovnání s tzv. normálními hodnotami, které jsme sami dosáhli, i když u hladiny imunních globulinů mléka dojníc nereagujících na tuberkulín jsme dosáhli dobré shody s autory zahraničními.

Sledováním rozptylu a reprodukтивности hodnot jednotlivých frakcí bílkovin mléčného séra jsme prokázali vhodnost použití elektroforézy na papíře k danému úkolu.

Souhrn

V literárním přehledu jsou shrnuty poznatky týkající se elektroforézy bílkovin mléčného séra, identifikace, označování a kvantitativní frakcí a metodicky důležité poznatky pro vypracování správné metodiky.

V části metodické byla navržena vlhká komora s elektrodovými nádobami a byl vypracován speciální způsob pro nanášení větších kvant zkoumaných roztoků bílkovin, který se nám osvědčil. Lze jej doporučit tam, kde se pracuje s roztoky chudými na bílkoviny.

V experimentální části bylo sledováno pomocí elektroforézy na filtračním papíře bílkovinné spektrum mléčného séra u 102 vzorků mléka. Z toho bylo 52 vzorků od dojníc reagujících kladně na tuberkulín, 30 vzorků od dojníc nereagujících na tuberkulín a 20 vzorků, které jako průměrné byly získány za svozových cisteren. Vzorky byly získány a vyšetřovány za okolností, jak je mléko předáváno do mlékáren.

Bylo zjištěno, že mléčné sérum od tuberkulín-pozitivních dojníc obsahuje zvýšené množství imunních globulinů proti mléku od dojníc nereagujících. Zvýšení imunních globulinů nastává na úkor komplexu β -laktoglobulinu. Tento kvantitativní přesun ve spektru mléčných bílkovin nejlépe charakterizuje A/G kvotient, jehož hodnota u mlék od nereagujících dojníc se pohybuje kolem 3,1 (mezni hodnoty 2,19 až 6,24) a u mlék od dojníc reagujících na tuberkulín kolem 1,8 (mezni hodnoty 0,70 až 2,20).

Dále bylo zjištěno, že hodnota imunních globulinů u vzorků od velkých skupin dojníc se prakticky neliší od hodnot dojníc zdravých.

V diskusí jsou uvedeny stavy dojníc, za kterých přichází v úvahu zvýšení hladiny imunních globulinů v mléčném séru a jsou diskutovány okolnosti hovořící pro pozitivní korelaci mezi hladinou imunních globulinů v séru mléčném a krevním.

Za určitých okolností lze na základě elektroforetického vyšetření mléčných bílkovin usuzovat na zamořenost prostředí, z něhož mléko pochází, a to především na zamořenost tuberkulózu.

Literatura

1. Beneš M.: Bílkovinné spektrum u brucelózního skotu. Diplomní práce, vet. fakulta, 1955. — 2. Bergmann G.: Über die Korrelationen zwischen dem Ausfall serologischer Reaktionen und dem Ergebnissen der elektrophoretischen Auftrennung der Eiweißfraktionen des Milchserums. Arch. f. Lebensmittelhyg. 1957, č. 7, str. 156-159. — 3. Biserte G., Breton A., Fontaine G.: Les protides du lait. Le Lait 1957, č. 363-364, str. 154-169. — 4. Boďa K., Koňá E.: Několko poznatků o dysproteinemiích u rozného statku. Vet. medicina, 1958, č. 6, str. 425-436. — 5. Boguth J.: Papierelektrophoretische Serumuntersuchungen bei Haussäugetieren. Zbl. f. Vet. Med. 1954, č. 4, str. 311-329. — 6. Dittmer A.: Papierelektrophorese, Jena, 1956. — 7. Grassmann, cit. Dittmer. — 8. Filip J.: Mikroelektroforéza bílkovin na filtračním papíře. Čas. lék. českých, 1953, č. 23, str. 645-647. — 9. Gál T.: Polarografický a elektroforetický výzkum bílkovin kravského mléčného séra. Prům. potravin, 1954, č. 4, str. 152-153 a 206-208. — 10. Hojovcová M.: Elektroforéza při TBC skotu. Referát přednesený na vědecké konferenci vet. fakulty, 1959. — 11. Chopard P.: Bestimmung der Eiweißfraktionen des Bluteserums bei den Haustieren mit der Papierelektrophorese, unter Berücksichtigung verschiedener Faktoren. Schweiz. Arch. Tierheilk. 1954, č. 5, str. 252-260. — 12. Izák Š.: Písemné sdělení. — 13. Jermolajev —: Zjišťování amboceptoru v mléce tbc dojníc Bezredkovým a Boquet-Negreovým antigenem. Klin. spisy Vys. šk. zvěrol., 1924, sv. I. 10. — 14. Kutáček M. a Kratochvíl L.: Primenění elektroforeza na buňky dle isledovanija bělkov syrovotky moloka zdorovyh i bruceleznyh korov. Biochimija, 1958, č. 3, str. 471-474. — 15. Middlebrook G. a Dubos; cit. Schmid. — 16. Oppl J., Kutáček M., Loštický C., Čížimský J.: Nová modifikace klinické mikroanalýzy bílkovin tělních. Čas. lék. českých, 1953, č. 23, str. 624-633. — 17. Renk W.: Untersuchungsergebnisse über den Eiweißgehalt der Milch von Kühen mit und ohne Mastitiden. Berl.-Münch. tierärztl. Wschr. 1958, č. 2, str.

23-26. — 18. Schmid G.: Untersuchungen über die Verwendbarkeit des Hämolyse-Tests nach Middlebrook zur Diagnose der Eutertuberkulose. Schweiz. Arch. Tierhik. 1954, č. 2, str. 51-56. — 19. Smith; cit. Gál. — 20. Sumcov B. M.: Frakcionirovanije belkov grudnovo moloka elektroforezom na bumage. Biochimija 1956, č. 6, str. 793-799. — 21. Schulte K. E., Müller F.: Elektrophoretische Studien an Milchproteinen. Milchwissenschaft 1955, str. 90-96, 130-133, 228-231, 270-273. — 22. Schuster K.: Papierelektrophoretische Untersuchungen an normalen und tuberkulösen Milchseren. Mntsh. Vet. Med. 1957, č. 10, str. 258-261. — 23. Vandegaer, a Miettinen, cit. Kutáček a Kratochvíl. — 24. Zícha B., Kalousová V., Neuman V., Piskač A., Hruška K.: Bílkovinné spektrum některých hospodářských laboratorních zvířat. Vet. medicina, 1957, č. 12, str. 835-854.

Электрофорез белков бесказеиновой молочной сыворотки с учетом доказательства происхождения молока из среды, неблагополучной по туберкулезу

Автор в статье подает литературный обзор сведений по электрофорезу белков бесказеиновой молочной сыворотки, по идентификации, обозначению и количеству отдельных фракций, а также сведений, важных с точки зрения разработки правильной методики.

В методической части автор предлагает применить камеру с электродными сосудами и разработан специальный оправдавший себя способ нанесения большего количества исследуемых растворов белков. Его можно рекомендовать в том случае, если работа ведется с бедными в отношении белков растворами.

В экспериментальной части автор при помощи электрофореза на фильтровальной бумаге исследовал белковый спектр бесказеиновой молочной сыворотки у 102 образцов молока, из которых 52 образца было взято от дойных коров, дающих положительную реакцию на туберкулин, 30 образцов — от дойных коров, дающих отрицательную реакцию, а 20 образцов было взято в качестве средних образцов из разных молочных цистерн. Образцы были получены и исследованы при тех же условиях, при каких молоко доставляется в молочную.

Автором было установлено, что бесказеиновая молочная сыворотка от коров, дающих положительную реакцию на туберкулин, содержит повышенное количество иммунных глобулинов по сравнению с молоком коров, дающих отрицательную реакцию. Повышение иммунных глобулинов происходит за счет комплекса β -лакто-глобулина. Это количественное изменение в спектре молочных белков лучше всего характеризуется A/G квоциентом, числовая величина которого у молока от коров, дающих отрицательную реакцию, колеблется около 3,1 (предельные величины от 2,19 до 6,24), у молока от коров, дающих положительную реакцию — около 1,8 (предельные величины от 0,70 до 2,20).

Дальше было установлено, что количество иммунных глобулинов у образцов, полученных от больших групп коров, практически не отличается от количества иммунных глобулинов в образцах от здоровых коров.

В статье приведены состояния дойных коров, при которых учитывается повышение уровня иммунных глобулинов в бесказеиновой молочной сыворотке и обсуждаются условия, свидетельствующие о положительной корреляции между уровнем иммунных глобулинов в сыворотке молока и крови.

При определенных обстоятельствах, на основе электрофоретического исследования белкового состава молока, можно судить о степени инфекций среды, из которой молоко происходит, а, главным образом, о степени ее зараженности туберкулезом.

Electrophoresis of Milk Serum Albumins with Regard to the Determination of Milk originating from Tuberculous Herds

The literary survey of this paper contains informations relating to electrophoresis of milk serum proteins, their identification, designation and quality of individual fractions, and methodically important points for the development of a correct method of investigation.

In the methodical part a wet chamber with electrode vessels has been suggested and a special mode of applying larger quantities of protein solutions under examination worked out; the latter has proved well and can therefore be recommended for solutions with low protein content.

In the experimental part the protein spectrum of milk serum in 102 milk samples was followed up with the aid of electrophoresis on filtering paper. Out of this number 52 samples came from dairy cows, whose reaction to tuberculin was positive, 30 samples were from tuberculin-negative dairy cows and 20 samples (as average ones) were taken from milk tank trucks. The samples were obtained and investigated at the same conditions as the milk was supplied to dairy plants.

It has been found, that the milk serum from tuberculin-positive dairy cows contains an increased amount of immune globulins compared with the milk from tuberculin-negative cows. The increase in the immune globulins takes place at the expense of the β -lactoglobulin complex. This quantitative shift in the spectrum of milk proteins is characterized best by the A/G quotient, the value of which in the case of the samples from tuberculin-negative cows varies about 3.1 (limiting values being 2.19 to 6.24), and in the case of tuberculin-positive cows, about 1.8 (limiting values 0.70 to 2.20).

Furthermore, it has been found that the value of the immune globulins in the milk samples from large groups of dairy cows does not practically differ from those of the samples from healthy dairy cows.

In the discussion are quoted the stocks of dairy cows in which the increase of the level of immune globulins in milk serum is to be taken into consideration, and the circumstances discussed which favour the positive correlation between the levels of immune globulins in the milk and blood serum.

Under certain circumstances it is possible, on the basis of the electrophoretic examination of milk proteins, to deduce an infection in the place from which the milk has been delivered, especially the infection with tuberculosis.

Příspěvek k otázce vztahu bakteriální flóry v pohlavním ústrojí k cystózní degeneraci Graafových folikulů u skotu

К вопросу соотношения между бактериальной флорой в половых органах и кистозной дегенерацией фолликул Графа у крупного рогатого скота

A Contribution to the Question of the Relation of the Bacterial Flora of the Genital Organs to the Cystic Degeneration of the Graaf's follicles in Cattle

MVDr. Zdeněk VLČEK

*Z porodnicko-gynekologické kliniky veterinární fakulty VŠZ v Brně, přednosta:
dopisující člen ČSAZV prof. MVDr. E. Přibyl*

Došlo dne 3. X. 1959

Realizace všestranného zvýšení užitkovosti skotu předpokládá mimo jiné úspěšné zdolávání neplodnosti, a to především u plemenic. Současné poznatky ukazují, že je nutno, jako možné příčině neplodnosti, věnovat více pozornosti funkčním poruchám, na jejichž vzniku se může podílet více exo- i endogenních faktorů a na jejichž etiologii proto dosud není jednotného názoru.

Literární přehled

Cystická degenerace Graafových folikulů se vyskytuje převážně u krav v nejlepším věku (3 až 7 let), dobrého výživného stavu, s vysokou dojitostí, zpravidla během prvních měsíců po porodu. Jalovice jsou postiženy jen velmi zřídka (tak např. z 352 případů zhodnocených Robertsem, 1955, bylo 13,9 % ve stáří 1 až 3 roků, 54,2 % ve stáří 5 až 6 roků, 25,1 % ve stáří 7 až 9 roků a jen 6,8 % nad 10 roků, pouze tři případy byly jalovice). V literatuře je referováno o nápadně vyšším procentu výskytu cystózní degenerace v určitých hospodářstvích, takže se předpokládá, že existují určité praedispoziční vlivy. Jako takové jsou uváděny nadměrná (Yamauchi, 1956, Fincher a spol., 1956, aj.) nebo naopak deficientní výživa (Studenecov, 1953, Schmidt, cit. podle Brodaufa, Grandchamp, 1953, aj.) zejména kvalitativní — nedostatek stopových prvků. Rovněž se zdá, že vztah k nápadně častému výskytu cystózní degenerace v určitých oblastech by mohla mít exploatace — např. nadměrné zatížení fyzickou námahou nebo vysokou dojitostí (Küst-Schaetz, 1953, aj.), způsob chovu (stájový odchov s omezeným pohybem) a snad i klimatické nebo jiné

vlivy. Na podkladě zjištěné vyšší frekvence cystické degenerace v určitých krevních liniích je též pokládána za dědičné onemocnění nebo se usuzuje na dědičnou praedispozici (Sonnenbrodt a Ranninger, 1949, Erikson, 1949, Olds, cit. Fincher a spol., 1956, aj.).

Dlouho tradované starší teorie se opíraly při vysvětlení vzniku této dysfunkce o primární noxu v pohlavním ústrojí. Podnětem k tvorbě cyst je podle nich neustálé dráždění bakteriálními toxiny nebo jinými látkami vznikajícími při chronických procesech hlavně v děloze. Tyto látky způsobí odumření vajíčka a naruší i některé složky stěny Graafova folikulu. Rovněž se předpokládalo, že proces je vyvolán proniknutím zárodků z postiženého endometria do ovarií ascendenční nebo lymfogenní cestou (Beschlehnov, 1952, Klobouk, 1953, Studenov, 1953, aj.). Küst - Schaetz, 1953, shodně s jinými autory jsou zastánci tohoto názoru pokud se týká tuberkulózy pohlavního ústrojí při níž jsou cysty často zjišťovány, někdy i u zvířat mladších jednoho roku. Uvedené teorie vznikly na základě klinických nálezů příznaků imitujících symptomy endometritid infekčního původu a poněvadž nebyla prováděna kontrolní šetření, udržely se dosti dlouho. Vlivem přesnějších poznatků o endokrinním řízení funkcí organismu včetně reprodukčního cyklu a výsledků patologicko-anatomických, histologických a bakteriologických vyšetření ustupují dnes do pozadí. Při detailním histologickém vyšetření cystických folikulů, endometria i jiných částí pohlavního ústrojí nebyly totiž shledány typické zánětlivé změny (sliznice endometria je nepravidelně hyperplastická, děložní žlázy často cystózně degenerované, submukóza infiltrována lymfocyty a plazmatickými buňkami [Laing, 1955], někdy jsou zjištěny atrofické změny a fibróza submukózy). Rovněž při bakteriologickém vyšetření nebyly ponejvíce zjištěny patogenní ani jiné zárodky a když, tak v malém množství. Obsah dělohy bývá zpravidla sterilní, obsah cyst téměř vždy (Garm, 1949, Nieberle - Cohrs, 1952). Podle Lainga, 1955, se izolované mikroorganismy zdají být spíše nahodilou kontaminací z pochvy. Garm, 1949, při svých pozorováních zjistil při cystózní degeneraci zřídka sekundární endometritis a její vznik je podle něho umožněn snadnějším proniknutím vaginální flóry do dělohy pootvřeným krčkem děložním, zejména ve státech se špatnými hygienickými podmínkami. Podle Holého a Kudělký, 1958, by bylo možno vznik těchto endometritid vztahovat na poslední porod nebo abortus.

Tvorba cyst je rovněž vysvětlována na podkladě Selyeho teorie o všeobecném adaptačním syndromu — organismus v případě ohrožení (při onemocnění, nadměrném zatížení, deficientní výživě apod.) omezuje funkci generativního cyklu bloádou vylučování gonadotropinu z předního laloku hypofýzy. Nedostatečným vylučováním gonadotropinu je sekundárně vyvolána insuficience cyklu, při níž vedle dystrofických známek je možno pozorovat blokování cyklu současně se vyskytujícími persistujícími folikuly a žlutými tělisky. Tento dočasný zánik cyklu je vyrovnávacím manévrem proti novému zatížení organismu (Schaetz, 1956).

V současné době je tvorba cyst vysvětlována poruchou sekrece předního laloku hypofýzy (Příbyl, 1958, Laing, 1955, Dawson, 1957 a 1958, Kraft, 1957 aj.). Tato porucha spočívá pravděpodobně v neschopnosti změnit sekreci folikulačního hormonu v sekreci hormonu luteinizačního. Dosud však není přesných údajů o vztazích a závislostech vedoucích ke vzniku cystózní degenerace Graafových folikulů — teprve další bádání ukáže, zda vznik spočívá v jemných dizonancích mezi FSH, FH a LH, progesteronem, kortikosteroidy nebo jiných, dosud nezjištěných faktorech (Holý a Kudělka, 1958). Výsledky posledních prací ukazují, že je nutno posuzo-

vat endokrinní soustavu (zejména hypofýzu, nadledvinku, štítnou žlázu a příštítná tělíska) vcelku a ne pouze izolovaně pohlavní ústrojí, neboť změny např. na ovariích jsou pouze částí komplexu změn vyvolaných poruchou endokrinního systému (Lesbouyer, 1944, Dawson, 1957, 1958, Garm, 1949, aj.). Oporou tohoto názoru jsou i komparativní studie objemu, váhy a histologické stavby hypofýzy a nadledvinky u nymfomanických a zdravých krav (zvětšení objemu a váhy hypofýzy a nadledvinky, zmnožení bazofilních buněk v předním laloku hypofýzy, hypertrofie korové části nadledvinky u nymfomanických krav).

Vlastní pozorování

Teorie, které považovaly za primárního činitele při vzniku cystické degenerace Graafových folikulů infekční onemocnění dělohy, nejsou dnes již většinou uznávány. Je však známa a i námi zjišťována značná hypersekrece hlenu serózního, častěji však mukopurulentního, někdy až purulentního charakteru, který je dosud v praxi nezřídka považován za příznak infekčního onemocnění komplikujícího cystózní degeneraci, a na podkladě toho prováděna i příslušná terapie. Rovněž vaginální nález celkově se v těchto případech blíží charakterem nálezu při zánětech endometria infekčního původu. Tato skutečnost nás přiměla k výzkumné práci, během níž jsme vyšetřili větší počet případů cystózní degenerace Graafových folikulů, a to zejména také po stránce mikrobiologické analýzy. Šlo částečně o případy ošetřené ambulantě porodnicko-gynekologickou klinikou, kde jsme měli možnost zhodnotit anamnestické údaje, výsledky klinického vyšetření (zevního, vaginálního a rektálního) a bakteriologického vyšetření vzorků sekretu odebraného ze zevní branky děložního krčku a spodiny poševní. U zbývajících typických případů cystózní degenerace, vyhledaných podle zevních příznaků na brněnských jatkách, byly vedle klinického vyšetření vyhodnoceny patologicko-anatomické změny a výsledky bakteriologického vyšetření pohlavních orgánů které byly odebrány ihned po odporažení.

Metodika

U první skupiny případů byly nejdříve zjištěny a zaznamenány (event. doplněny z evidečních záznamů) anamnestické údaje, při čemž jsme mimo obvyklých dat (stáří, počtu porodů, jejich průběhu, počtu osemnění, délky neplodnosti apod.) sledovali zejména pohlavní cyklus — data říje, její intenzitu, chování zvířete, dále též podmínky v chovu — způsob ustájení, hygienu, krmnou dávku aj. Následovalo klinické vyšetření zvířete nejdříve adspekci a palpaci, při němž jsme zjišťovali změny na pánevních vazech, vulvě a okolí, po případě doplňovali vlastním pozorováním anamnestické údaje o chování zvířat. Při rektálním vyšetření jsme obvyklým způsobem zjišťovali velikost uteru, symetrii rohů, obsah, tloušťku stěny děložní a její kontraktilitu, změny na ovariích event. ostatních částech pohlavního ústrojí. Vaginální vyšetření bylo prováděno po obvyklé přípravě zvířete pomocí Albrechtsenova spekula a poševní lampičky. Byl posuzován zejména stav poševní sliznice, množství a kvalita sekretu ji pokrývajícího nebo se hromadícího na spodině poševní, uložení *portia vaginalis uteri*, vzhled jeho řas, stupeň pootevření zevní branky, výtok hlenu aj. Současně byl proveden odběr materiálu k bakteriologickému vyšetření. K tomu účelu byl odebírán tam-

ponem z pootevřeného krčku děložního sekret způsobem, který vylučoval kontaminaci dotykem kaudálnějších úseků pochvy (pomocí nástroje popsaného v jiné autorově práci). U většiny zvířat byl rovněž odebrán ke kontrolnímu posouzení vzorek hlenu hromadícího se kaudálněji na spodině poševní.

Po odběru materiálu bylo provedeno ošetření zvířete spočívající ponejvíce v aplikaci choriového gonadotropinu (Prolan firmy Bayer, Praedyn Spofa) v některých případech přímo do cyst (Holý - Kudělka, 1958) nebo parenterálně (intravenózně nebo subkutánně), v některých případech rozdrcení cyst *per rectum*. U části zvířat bylo toto ošetření doplněno ošetřením dělohy antibiotiky nebo desinficiencemi. Výsledky ošetření v této práci nehodnotíme, poněvadž nespádají v její rámec a budou popsány v jiné práci z porodnicko-gynekologické kliniky.

Odebraný materiál byl bezprostředně dále zpracován — provedena kultivace na dvě výchozí půdy (agar s 10 % defibrinované beraní krve a Endo-agar, někdy ještě obyčejný agar). Ze vzorků sekretu byly pořízeny rozetěry a zbarveny metodou Gramovou, někdy též Giemsa-Romanowskyho nebo Ziehl-Nielsenovou. Inkubované plotny byly posuzovány po 24, 48 a 72 hodinách, kdy byl s konečnou platností stanoven počet kolonií a jemu odpovídající stupeň osídlení zárodky. Kultivace na plotny byla prováděna běžně používaným způsobem umožňujícím již v primokultuře zachycení jednotlivých kolonií. Ukázalo se však, že ve většině případů byl porost tak slabý, že toho ani nebylo třeba. Inkubace byla prováděna pouze v aerobním prostředí, avšak jak ukazují výsledky jiných prací (Taubrich, 1958, aj.) i naše pokusné kultivace, nevyskytují se mezi izolovanou flórou často obligátní anaerobní zárodky. Z izolovaných kolonií byly hotoveny preparáty, jednotlivé kmeny pasážovány a na podkladě biochemických a jiných vlastností zařazeny podle Bergeyovy systematiky.

U druhé skupiny případů zahrnující vyšetření 43 pohlavních orgánů zvířat s cystózní degenerací Gr. f. odporazených na jatkách jsme postupovali tak, že jsme nejdříve adspekci vyšetřili ustájená zvířata určená k odporazení a vyhledali kusy se zevními příznaky cystózní degenerace (uvolněnými pánevními vazy, cedematózně prosáklou vulvou apod.), které na sebe nezřídka upozornily již svým nápadným chováním (znepokojováním sousedních zvířat snahou se na ně vzepnout). Tyto kusy jsme vyšetřili orientačně rektálně a sledovali při porážení. Po odporazení a otevření dutiny břišní byly pohlavní orgány odebírány k podrobnějšímu vyšetření. Při něm jsme zjišťovali změny na děloze (velikost, tloušťku a konzistenci stěny, stav endometria aj.), event. změny na perimetriu, širokých vazech, vejcovodech a ovariích. Sledovali jsme lokalizaci cyst, jejich rozměry, charakter stěny a obsah. Jako cystózně degenerované Graafovy folikuly jsme hodnotili útvary velikostí značně převyšující obvyklé rozměry Graafova folikulu, event. útvary nepřesahující sice tyto rozměry, ale nacházející se ve vaječnicích ve větším množství takže v souhrnu ostatních příznaků nebylo pochyb o jejich charakteru. Odběr materiálu k bakteriologickému vyšetření byl zde prováděn tak, že část rohu děložního za tělem děložním byla ožehuta, otevřena sterilními nástroji a uchopena do peanů tak, že po jejich naklonění vyhrázla neporušená sliznice endometria. Sterilním tamponem byl proveden výtěr, takže povrch tamponu při zavedení do lumina rohu byl ve styku s větší plochou endometria. Materiál byl zpracován výše uvedeným způsobem. Od původně zamýšlené kultivace z vejcovodů bylo pro nesnadnou techniku a snadnou možnost kontaminace upuštěno. Byla však prováděna kultivace z obsahu cystózně změněných Graafových folikulů po tepelné koagulaci částí jejich stěny a nabodnutí sterilní lancetou.

Ve skupině 25 zvířat ošetřených ambulantně je zahrnuto 24 krav a jedna jalovice, u nichž bylo vyžádáno ošetření pro nemožnost koncepce po několika-násobném osemenění a někdy i léčení. U velké většiny z nich byla již delší dobu pozorována nepravidelnost cyklu — intervaly mezi jednotlivými říjemi se zkracovaly, intezita říje se zvyšovala (12 zvířat, tj. 48 %), u osmi (32 %) se jevila již jako permanentní říje. Pouze u dvou zvířat (8 %) byla cystózní degenerace provázena anoestrií. U zbývajících tří (12 %) byla říje výraznější, ale pravidelná. Všechny krávy byly trvale ustájeny bez možnosti výběhu, stáje byly přiměřeně světlé, dobře větrané, po hygienické stránce nebylo ve způsobu ustájení ve většině případů shledáno větších závad. Výživný stav zvířat byl vesměs velmi dobrý, což odpovídalo krmným dávkám, které byly po stránce kvalitativní i kvantitativní přiměřené. Produkce mléka byla před dostavením se prvních příznaků dysfunkce velmi dobrá (zvířata byla označována ošetřovateli za kusy s bývalou nadprůměrnou dojivostí). Až na jedno byla všechna červenostrakatého plemene, jejich stáří se pohybovalo od 2½ do 13 roků. Z celkového počtu zvířat bylo 5 (20 %) ve stáří do 4 roků, 13 (52 %) ve stáří 4 až 8 roků a 7 (28 %) nad 8 roků. Mezi postiženými zvířaty byla pouze jedna jalovice (4 %), 13 zvířat bylo I-IIIpar, 5 IV-VIpar, 6 VII-IXpar. S největším výskytem cyst jsme se setkali v zimních nebo jarních měsících (72 %) proti 28 % v měsících letních.

Zevní příznaky provázející cystózní degeneraci Gr. f. byly u většiny zvířat velmi zřetelné. Některá zvířata byla již při příchodu do stáje nápadná změnou psyche — neklidem, znepokojováním okolních zvířat, zejména snahou se na ně vzepnout. Široké vazy pánevní byly značně uvolněny a v důsledku toho vyniklo typické vysoké nasazení ohonu. Stydké pysky byly v různém stupni prosáklé s vymizelou kresbou. Ve ventrální komise vulvy, v jejím okolí nebo na spodní straně ohonu jsme většinou nacházeli stopy sekretu serózního, častěji však mukopurulentního charakteru.

Vaginálním vyšetřením jsme zjišťovali, že sliznice předsině poševní, ve větší míře poševní, je prosáklá, hyperemická, řasy *portia vaginalis uteri* byly zbytnělé, prosáklé, uvolněné a zevní branka děložního krčku v různém stupni otevřena. Z krčku vytékal téměř u všech (96 %) zvířat sekret, který se zpravidla hromadil na spodině poševní. Jeho charakter byl u 5 (20 %) zvířat serózní, čirý, u 6 (24 %) již mírně kourňově zkalený, u 12 (48 %) mukopurulentní a u 1 (4 %) purulentní. Nápadnou byla hypertrofie, někde i hyperplasie řas zevní branky děložního krčku. U dvou případů (8 %) jsme našli i ve stěně poševní větší počet drobných cyst. S cystami v průběhu Gartnerových vývodů nebo cystami Bartholiniho žláz jsme se nesetkali.

Při rektálním vyšetření jsme u 11 zvířat (44 %) nezjistili markantních odchylek ve velikosti dělohy a konzistenci její stěny. Avšak u více jak poloviny případů (14, tj. 56 %) přesahovala velikost uteru běžný průměr. Stěna děložní byla při palpaci mírně ztlustělá, avšak zřetelně ochablá a teprve po delší době docházelo k nevýrazné kontrakci. Rohy děložní byly bez rozpoznatelného obsahu. Ovaria byla velmi snadno palpovatelná, ovaria s cysticky degenerovanými folikuly byla nápadná již svou velikostí (od švestky do velkého slepičího vejce). Ve tkáni ovaria bylo možno pohmatem lehce zjistit velké fluktuující měchýřky, v četných případech byla fluktuace zjištěna po celém povrchu zvětšeného ovaria. Na rozsáhlou atrofii ovariální tkáně u takto změněných ovarii jsme mohli usoudit z několika případů, u nichž se po rozduření cyst zmenšil objem ovaria na zlomek původní velikosti. U 11 zvířat (44 %) jsme zjistili cystózní dege-

neraci Graafových folikulů na jednom, z toho u 8 (32 %) na pravém a u 3 (12 %) na levém ovariu, u 14 (56 %) na obou ováriích.

Při vyšetření pohlavních orgánů zvířat odporažených na jatkách byly vyhodnoceny pouze případy, u nichž již podle velikosti ovaríí a cystických útvarů ve spojení se zevními příznaky nebylo pochyb, že jde o cysty. Od zaznamenávání anamnestických údajů jsme upustili, poněvadž nebyly ve většině případů dostupné. Rovněž změny na pochvě nebyly zachyceny, poněvadž při zpracování kusu docházelo k jejímu rozrušení.

Velikost dělohy jsme u 18 případů (41,8 %) posoudili jako normální, u 4 (9,3 %) jsme se setkali s atrofií, u 6 (13,9 %) s mírnou, u 15 (34,8 %) zřetelnou hypertrofií uteru. V jednom případě byl objem dělohy nápadně zvětšen, rohy děložní vykazovaly zřetelnou asymetrii a fluktuaci imitující asi 2,5- až 3měsíční březost. Stěna děložní byla enormně ztenčena s velmi zřetelně se rýsující cévní pletení, obsahem dělohy byl řídký zkalený hlen (obráz. č. 1). Mimo tohoto případu jsme zjišťovali jen mírnou asymetrii ve fyziologických mezích. Stěna děložní, zejména u případů s hypertrofií uteru, byla v různém stupni zbytnělá, oedematózně prosáklá, její konzistence byla u více jak poloviny případů měkce elastická, nápadně ochablá. Rovněž endometrium bylo v 23 případech (53,4 %) zbytnělé, hebké, šťavnaté, překrvené a pokryto zvýšeným množstvím hlenu. U pěti orgánů z uvedeného počtu jsme zjistili makroskopicky cystické rozšíření děložních žlázek. U tří případů (6,9 %) bylo endometrium naopak suché, nízké, atrofické, u zbývajících počtu (17, tj. 39,5 %) jsme nezjistili odchylek od normálu. Vzhled sekretu pokrývajících u většiny případů ve zvýšeném množství endometrium byl u 19 (44,1 %) případů čirý, u 14 (32,7 %) šedě zkalený až výrazně mukopurulentní, v jednom (2,3 %) purulentní, vždy bez zápachu.

Na vejcovodech jsme nezjistili makroskopicky rozpoznatelné změny s výjimkou dvou případů, kdy jsme se setkali v průběhu jednoho vejcovodu s jeho značným rozšířením obsahujícím téměř čirou tekutinu — hydrosalpingem.

Změny na postižených ováriích byly velmi nápadné — ovaria byla enormně zvětšena a ve většině případů podlela jejich tkáň ve značném rozsahu tlakové atrofii, takže se ovarium jevílo jako velký, zpravidla po celém povrchu fluktuující útvar, tvořený, jak jsme se později přesvědčili, jednou centrální nebo několika cystami. V místě největšího vyklenutí cyst byla jejich stěna ztenčena, jemná, ale dosti pevná, tmavě zbarvena prosvítajícím mokem. Obsahem cystických folikulů byla nažloutlá až nahnědlá, mírně hlenovitá tekutina, která po nabodnutí cysty prudce vytékala. Na průřezu jsme nacházeli cysty jedno- i vícekomorové, zbytky zaniklých přepážek jsme však našli i u několika velkých jednodukomorových cyst. Rozměry námi zjištěných největších cyst dosahovaly velikosti husího vejce — v těchto případech bylo zpravidla celé ovarium přeměněno v jedinou nebo několik cyst a došlo k téměř úplnému zániku parenchymu. Shodně s literárními údaji i my jsme našli na nepostižených ováriích nebo v zachované tkáni změněných ovaríí cyklické změny, nemůžeme se však vyjádřit o jejich stáří nebo funkci. Cystózně degenerované folikuly byly u této skupiny lokalizovány v sedmi případech (16,2 %) pouze na levém ovariu, v 11 (25,5 %) na pravém a v 25 (58,1 %) na obou ováriích. U tří případů jsme zjistili i na širokém vaz u ojedinělé drobné cysty vyplněné čirou tekutinou.

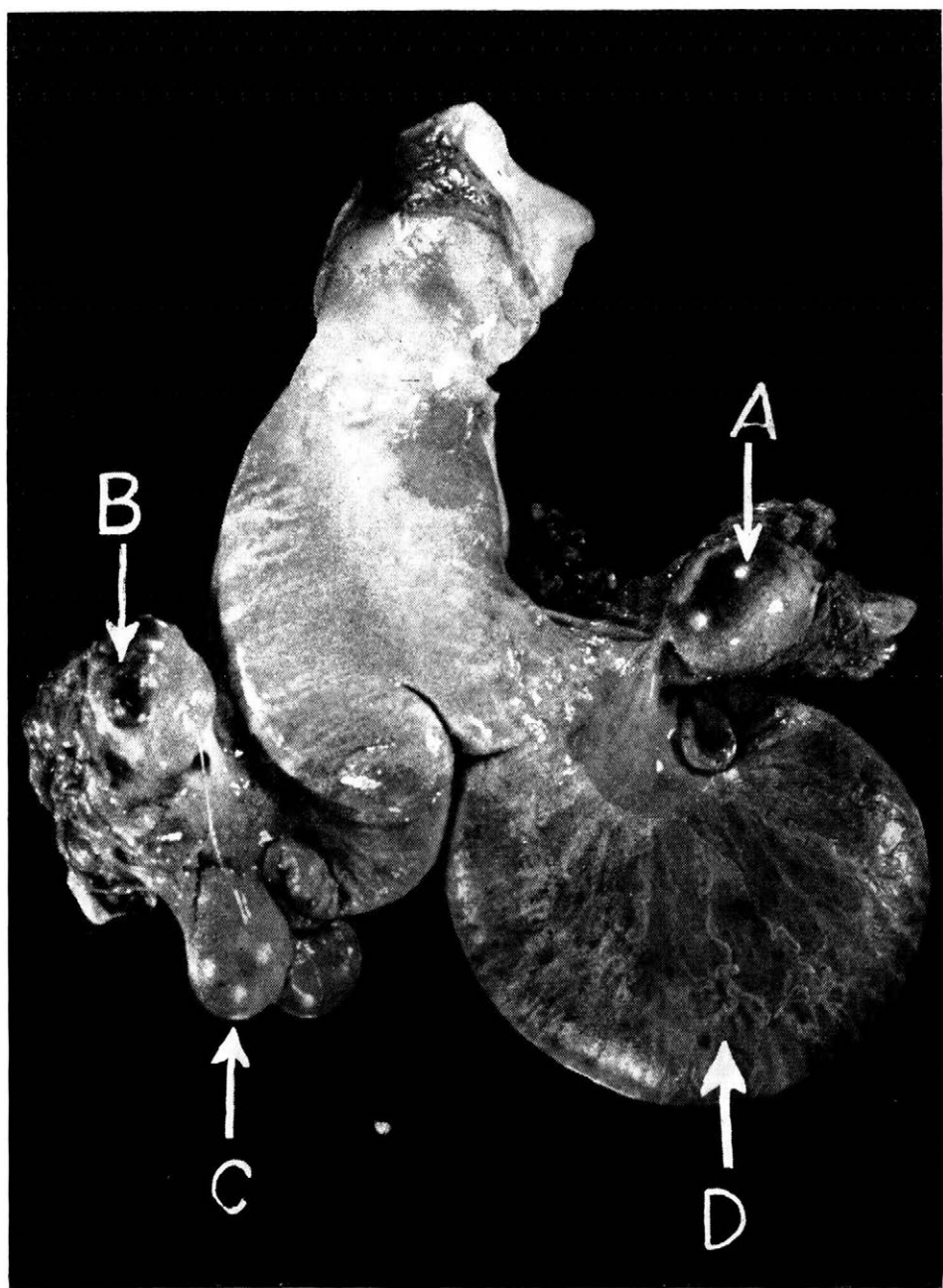
1. Pohlavní orgány krávy.

A — B — cystózně degenerovaná ovaria.

C — hydrosalpinx.

D — enormně ztenčená stěna zvětšeného levého rohu děložního se zřetelně se rýsující cévní pletení.

Foto: Dr. Věžník VUV.





I. Přehled mikrobiálních nálezů u případů cystózní degenerace Graafových folikulů

Případy ošetřené ambulantně			Případy vyšetřené na jatkách					
poř. číslo	sekret odebraný ze spodiny poševní	sekret odebraný ze zevní branky děložního krčku	poř. číslo	sekret odebraný z dělohy	obsah cystózně deg. folikulů	poř. číslo	sekret odebraný z dělohy	obsah cystózně deg. folikulů
1	<i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i> , <i>M. candidus</i> , neurč. plíseň	<i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i>	1	<i>M. freudenreichii</i> <i>Str. faecalis</i> , vzdušná plíseň	sterilní	26	sterilní	sterilní
2	—	sterilní	2	sterilní	sterilní	27	sterilní	sterilní
3	<i>E. coli</i> , <i>M. candidus</i> <i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i> , <i>B. subtilis</i>	3	sterilní	sterilní	28	sterilní	sterilní
4	<i>Str. faecalis</i> , <i>Str. faecalis</i> var. <i>zymogenes</i> , neurč. sporulát	<i>Str. faecalis</i> , <i>Str. faecalis</i> var. <i>zymogenes</i> , neurč. sporulát	4	sterilní	sterilní	29	sterilní	<i>M. candidus</i>
5	<i>Str. acidominimus</i> , <i>B. cereus</i> , neurč. Gr-tyčinky	sterilní	5	sterilní	—	30	<i>Str. acidominimus</i> , <i>M. candidus</i> , neurč. sporulát	sterilní
6	<i>Proteus vulgaris</i>	sterilní	6	<i>Cor. bovis</i> , <i>M. ureae</i> , <i>Serratia</i>	sterilní	31	<i>Alcaligenes faec. Cor. bovis</i> , <i>M. ureae</i>	—
7	<i>Cor. bovis</i> , <i>M. flavus</i> , neurč. sporulát	sterilní	7	<i>Str. faecalis</i> , <i>Str. f. var. zymogenes</i> , <i>Str. bovis</i> , <i>E. coli</i> , <i>M. flavus</i> , <i>M. candidus</i> , at. Gr-tyčinky	sterilní	32	sterilní	sterilní
8	<i>Str. acidominimus</i> <i>Aerob. cloacae</i>	<i>Str. acidominimus</i> <i>Aerob. cloacae</i>	8	sterilní	—	33	sterilní	—
9	<i>E. coli</i> , <i>M. flavus</i> , <i>M. ureae</i>	sterilní	9	sterilní	sterilní	34	<i>Str. acidominimus</i> , <i>Str. bovis</i> , <i>Serratia</i>	sterilní
10	<i>Cor. bovis</i> , <i>E. coli</i> , <i>M. candidus</i> , neurč. <i>Sarcina</i>	<i>Cor. bovis</i> , atyp. diphter. zárodek	10	<i>Cor. bovis</i> , <i>M. epidermidis</i> , atyp. diphter. zárodky	—	35	sterilní	sterilní
11	<i>Cor. bovis</i> , <i>Str. faecalis</i> , neurč. plíseň	<i>Str. faecalis</i> , neurč. kvasinky	11	sterilní	sterilní	36	sterilní	sterilní
12	<i>Str. acidominimus</i> , <i>E. coli</i> , <i>Cor. bovis</i> , neurč. <i>Sarcina</i> , at. dipht. zár.	neurč. vzdušná plíseň	12	sterilní	<i>M. flavus</i>	37	<i>M. flavus</i> , atyp. dipht. zárodky	sterilní
13	<i>Proteus vulgaris</i> neurč. sporulát	sterilní	13	<i>Str. faecalis</i> , <i>Str. bovis</i> , <i>E. freundii</i> , <i>M. flavus</i> , <i>M. conglomeratus</i>	sterilní	38	sterilní	sterilní
14	<i>E. coli</i> , <i>M. candidus</i> , <i>B. subtilis</i>	<i>M. candidus</i> , neurč. vzdušná plíseň	14	sterilní	sterilní	39	sterilní	sterilní
15	<i>Cor. bovis</i> , <i>B. subtilis</i> , <i>E. freundii</i>	sterilní	15	<i>E. coli</i> , <i>M. candidus</i> , <i>Cor. renale</i>	—	40	sterilní	sterilní
16	<i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i> , <i>M. ureae</i> , neurč. <i>Sarcina</i> a Gr-tyčinky	sterilní	16	sterilní	sterilní	41	<i>Str. acidominimus</i> , <i>M. candidus</i>	sterilní
17	<i>Str. faecalis</i> , atyp. diphteroidní zárodky, neurč. Gr-tyčinky	<i>Str. faecalis</i> , <i>Cor. hoagii</i>	17	sterilní	sterilní	42	sterilní	sterilní
18	—	sterilní	18	<i>Cor. bovis</i> , <i>M. epidermidis</i>	sterilní	43	sterilní	sterilní
19	<i>B. subtilis</i> <i>E. freundii</i>	sterilní	19	sterilní	sterilní			
20	—	sterilní	20	<i>Str. faecalis</i> , <i>E. coli</i> , <i>E. freundii</i> , <i>M. varians</i> , neurčená plíseň	sterilní			
21	—	<i>Str. equinus</i> , <i>Str. acidominimus</i>	21	sterilní	sterilní			
22	<i>Str. acidominimus</i> , <i>M. luteus</i> , <i>Cor. bovis</i> , neurč. plíseň	sterilní	22	<i>Cor. bovis</i> , atyp. diphteroidní zár. vzdušná plíseň	—			
23	<i>Str. acidominimus</i> , <i>M. candidus</i> , neurč. Gr±sporulát	<i>M. candidus</i>	23	<i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i> , <i>Aerob. cloacae</i> , atyp. dipht. zárodky	sterilní			
24	—	sterilní	24	<i>Str. faecalis</i> , <i>Str. f. var. zymogenes</i> , <i>E. coli</i> , <i>M. conglomeratus</i>	sterilní			
25	<i>E. coli</i> , <i>M. epidermidis</i> , <i>M. flavus</i>	<i>M. candidus</i> , <i>M. epidermidis</i>	25	<i>M. luteus</i> , <i>M. candidus</i> , <i>Cor. bovis</i>	sterilní			

Výsledky bakteriologického vyšetření

Při vyšetření sekretu odebraného ze zevní branky děložního krčku 25 krav s cystózní degenerací Graafových folikulů bylo shledáno 52 % vzorků sterilních, při vyšetření sekretu odebraného z rohů děložních bylo 60,4 % vzorků sterilních. Obsah cystózně degenerovaných folikulů, vyšetřený u 36 případů, byl shledán v 95,5 % sterilní. U zbývajících počtu případů byl zjištěn vesměs s abý porost flórou, jejíž přehled je uveden v tabulce I. Při kultivaci ze sekretu hromadícího se kaudálněji na spodině poševní byla ve všech případech prokázána bakteriální flóra.

Počtem kmenů izolovaných ze sekretu odebraného v zevní brance děložního krčku nebo v děloze převládaly mikrokoky (21 kmenů) nad streptokoky (19 kmenů), difteroidními zárodky (14 kmenů), tyčinkami z čeledi *Enterobacteriaceae* (13 kmenů), blíže neurčovanými plísněmi a kvasinkami (6 kmenů) a sporulujícími zárodky (5 kmenů). Blížším určením jsme zjistili, že izolované druhy zárodků, které se u obou skupin v podstatě nelišily, jsou z větší části shodné s druhy, které jsme nacházeli v konečných částech vývodných pohlavních cest klinicky zdravých a plodných zvířat a které je tedy možno právem označit jako běžné osídlení těchto částí pohlavního ústrojí.

Z mikrokoků to byly hlavně *M. candidus*, *flavus*, *epidermidis*, *conglomeratus*, sporadicky *M. ureae*, *luteus*, *varians* a *freudenreichii*. Patogenní mikrokoky nebyly zjištěny, pouze jeden kmen (*M. epidermidis*) měl hemolytické vlastnosti.

II. Přehled osídlení genitálu zárodky u případů cystózní degenerace Graafových folikulů a zdravých krav

	Materiál	Počet případů	Stupeň osídlení zárodky							
			I.		II.		III.		IV.	
			počet	%	počet	%	počet	%	počet	%
Cystózní degenerace Graafových folikulů	Sekret odebraný z dělohy	43	26	60,4	10	23,2	5	11,6	2	4,6
	Obsah cystózně degenerovaných folikulů	36	34	94,5	2	5,5	—	—	—	—
	Sekret odebraný ze zevní branky děložního krčku	25	13	52	7	28	4	16	1	4
Zdravá zvířata	Sekret odebraný ze zevní branky děložního krčku	33	16	48,4	13	39,3	3	9	1	3

Stupně osídlení zárodky:

- I. — sterilní
- II. — ojediné kolonie do celkového počtu 5 na plotně
- III. — porost nepřevyšující počet 15 kolonií na plotně
- IV. — větší porost

Z izolovaných 19 kmenů streptokoků se jednalo v 11 případech o enterokoky (*Str. faecalis*) a v osmi případech o viridující streptokoky (*Str. acidominimus*, *bovis* a *equinus*). Beta-hemolytické streptokoky nebyly zjištěny. Difteroidní zárodky zjištěné v počtu 14 kmenů byly v sedmi případech určeny jako *Cor. bovis*, jeden kmen se vlastnostmi shodoval s *Cor. renale*, další s *Cor. hoagii*. Zbývajících pět kmenů se svými vlastnostmi neshodovalo se žádným známějším korynebakteriem (blížily se Bergeyem uváděným saprofytním korynebakteriím z vody). Z Gr-tyčinek z čeledi *Enterobacteriaceae* byla nejhojněji zastoupena *E. coli* (5 kmenů) před *E. freundii* (2 kmeny), *Aerobacter cloacae* (2 kmeny), *Alcaligenes faecalis*, *Serratia* (2 kmeny) a jedním blíže neurčeným, blížícím se vlastnostmi *Klebsiellám*. V menším počtu (6 kmenů) byly zjištěny neurčované plísňe a kvasinky nebo saprofytní sporotvorné zárodky (5 kmenů — *B. subtilis*, *B. cereus* var. *mycoides* a dva blíže neurčené).

Pro snazší přehlednost jsme zařadili jednotlivé případy podle množství izolovaných zárodků do čtyř skupin: do skupiny I. ty, u nichž byla kultivace negativní, do skupiny II. případy s porostem ojedinělých kolonií do celkového počtu pěti, do skupiny III. případy s porostem nepřevyšujícím počet 15 kolonií na plotně a do skupiny IV. případy s větším porostem (tabulka II).

Na základě výsledků vyšetření sekretu odebraného v zevní brance děložního krčku 25 zvířat bylo možno zařadit 13 zvířat (52 %) do skupiny I. (sterilní), a to i ve většině případů, kdy byla prováděna kontrolní kultivace. Pouze ve dvou případech se výsledek opakované kultivace lišil od prvního nálezu, šlo však rovněž jen o ojedinělé kolonie běžné saprofytní mikroflóry. U 12 zvířat (48 %) byl zjištěn na plotnách porost různé intenzity, většinou však velmi slabý. Sedm případů (28 %) bylo možno zařadit do skupiny II., 4 (16 %) do skupiny III. a jen 1 (4 %) do skupiny IV. Při kultivaci ze sekretu hromadického se kaudálněji na spodině poševní bylo osídlení co do počtu druhů i množství zárodků již větší, a to i u případů, u nichž byl sekret odebraný v zevní brance sterilní, po stránce kvalitativní se nálezy v podstatě nelišily.

Při kultivaci z endometria 43 pohlavních orgánů nebyl u 26 případů (60,4 %) zjištěn žádný porost ani po 72hodinové inkubaci. Ze zbývajících počtu 17 případů (39,5 %), kdy byl zjištěn porost, jsme mohli 10 (23,2 %) na základě nálezu ojedinělých kolonií zařadit do skupiny II., 5 (11,6 %) do skupiny III. a jen 2 (4,6 %) do skupiny IV. U jednoho z posledních však nás masivní porost směsí více druhů saprofytních mikrokoků, streptokoků, tyčinek z čeledi *Enterobacteriaceae* i jiných zárodků opravňuje k domněnce, že zde šlo o kontaminaci.

Kultivace z obsahu cystózně degenerovaných Graafových folikulů, která byla prováděna u 36 případů, byla s výjimkou dvou případů (5,5 %) negativní přes to, že byl mok rozetřen v souvislé vrstvě po celém povrchu plotny. V uvedených dvou případech šlo o ojedinělé kolonie koků, které je možno přičíst náhodné kontaminaci.

Diskuse

Zhodnotíme-li jen stručně, pokud rámec práce dovoluje, klinické a patofyziologicko-anatomické nálezy u námi vyšetřených případů cystózní degenerace Graafových folikulů, můžeme říci, že se vcelku nelišily od nálezů známých z literárních údajů. U většiny ambulantně ošetřovaných zvířat jsme se setkali s poruchami cyklu — u 48 % s častou, intenzivnější, u 32 % již permanentní říjí; neúměrně nízký počet (8 %) případů, kdy byla dysfunkce provázena anestroíí, lze přičíst

okolnosti, že jsme případy s nepravidelnou nebo permanentní říjí vyhledávali. Zda u případů se zaniklou říjí šlo o cysty folikulo-luteinální, žlutého těliska nebo starší folikulární, nemohli jsme na podkladě klinického vyšetření určit. Shodně s údaji Robertsovy (1955), Garmovými (1949), Dawsonovými (1957-8) aj. byly nejčastěji postiženy krávy dobrého výživného stavu ve stáří 4 až 8 roků (52 %) po prvním až třetím porodu, převážně během zimních a jarních měsíců (72 %). Okolnost, že šlo vesměs o krávy s bývalou nadprůměrnou dojivostí, podporuje názor Küst-Schaetzův (1953) a jiných autorů, že nadměrná exploatace — v tomto případě vysoká dojivost — může být jedním z činitelů praedisponujících tuto dysfunkci. Změny na širokých vazech pánevních a pohlavním ústrojí postižených zvířat byly velmi výrazné. Charakteristická byla u většiny zvířat zvýšená sekrece hlenu ponejvíce mukopurulentního charakteru, již odpovídal i stav endometria. Ve shodě s údaji Lainga (1955), Riečka (1958), Holého-Kudělků (1958) aj. přesahovaly i u většiny našich případů rozměry dělohy běžný průměr a její stěna byla sice mírně ztlustělá, ale zřetelně ochablá. Pouze v jednom případě jsme zjistili význačnější zvětšení objemu uteru s asymetrií a enormně ztenčenou stěnou rohů — mukometru imitující 2,5 až 3měsíční březost. Velikost ovaríí s cystózní degenerovanými folikuly se ve většině případů pohybovala od velké švestky do velkého slepičího vejce, shodně s většinou literárních údajů byla i u našich zvířat postižena nejčastěji obě ovaria (57,5 %), v případě jednostranné cystické degenerace častěji ovarium pravé (27,9 %) než levé (14,7 %). Podobně jako Studenecov (1953), Gruber (1952) aj. i my jsme našli na nepostižených ovariiích nebo v zachované tkáni změněných ovaríí cyklické změny, nemůžeme se však vyjádřit o jejich stáří nebo funkci. Potvrzením údajů Garmových (1949), Robertsovy (1955), Holého a Kudělků (1958) aj. jsou též naše ojedinělé nálezy makroskopicky zjistitelné cystické dilatace děložních žlázek, drobných cyst v pochvě a na širokých vazech děložních, mucometry a hydrosalpingu. Cysty v průběhu Gärtnerových vývodů a cysty Bartholiniho žláz jsme nezjistili.

Názory na etiologii cystózní degenerace Graafových folikulů dozraly během desítiletí mnoho změn, je však nutno říci, že etiologie není dosud uspokojivě objasněna. Vlivem poznatků o endokrinním řízení tělesných funkcí organismu včetně sexuálního cyklu ustupují do pozadí názory, které pokládaly za primárního činitele při jejím vzniku narušení pohlavního ústrojí infekčními zárodky nebo jejich toxiny. Tak ještě Studenecov (1953), Beschlebnov (1952) aj. uvádějí, že v obsahu cyst jsou často zjištěny tytéž zárodky, které vyvolaly zánetlivé změny v jednotlivých částech pohlavního ústrojí. To nemůžeme na základě našich nálezů ve shodě s pozdějšími literárními údaji potvrdit. Nebyla však diskutována otázka, zda a v jaké míře se mikroflóra, byť i sekundárně, spoluúčastní na vzniku některých symptomů provázejících takřka pravidelně cystózní degeneraci, zejména příznaků shodných s příznaky endometritid. Je známo, že konečné části urogenitálního traktu jsou osídleny pravidelně mikroflórou, která již není pokládána vždy za patogenní, ale spíše běžné „fyziologické“ osídlení. I tato flóra se však může za určitých okolností — při oslabení organismu různými vlivy — enormně pomnožit, proniknout do hlubších částí pohlavního ústrojí a stát se patogenní. Za normálních okolností jsou tyto části pohlavního ústrojí zpravidla sterilní. Pronikání zárodků do nich je umožněno řadou činitelů, nejčastěji se tak stane při porodu a v puerperiu, zejména neprobíhaly-li bez závad. Mezi těmito činiteli jsou nezděděny i hormonální poruchy. Je pochybitelné, že teoreticky by při cystózní degeneraci Graafových folikulů mělo být pronikání zárodků do dělohy usnadněno v důsledku otevření děložního krčku

při častější nebo permanentní říji. Tato okolnost je také uváděna ve vztahu k sekundárním endometritidám, které někdy cystózní degeneraci provázejí. S tímto názorem se ztotožňuje např. Garm (1949), který pozoroval sice endometritidy zřídka, zejména však v chovech se špatnými hygienickými podmínkami. Holý - Kudělka (1958) poukazuje i u těchto endometritid na možnost vzniku při posledním porodu nebo abortu. Je ovšem otázkou, zda u všech „endometritid“, o nichž bylo v souvislosti s cystózní degenerací hovořeno, šlo o infekční endometritidy. Jejich výskyt není potvrzován patologicko-anatomickými, histologickými a bakteriologickými nálezy novějších prací a ani nám se je při našich patologicko-anatomických a zejména bakteriologických vyšetřeních nepodařilo prokázat. [Pokládáme však za nutné uvést, že shodně s Küst - Schaetzem (1953) aj. autory jsme se v rámci jiné práce — při sledování frekvence tuberkulózy pohlavního ústrojí — setkali s nápadně vysokým výskytem cystózně degenerovaných folikulů u tuberkulózních zvířat. Tyto případy jsme zde neuvedli.] Je nesporné, že v četných případech vedl a snad i vede ke stanovení této diagnózy nález příznaků imitujících příznaky endometritid infekčního charakteru. Těmito nálezy byla ovlivněna i terapie — starší autoři kladli důraz na ošetření dělohy antibakteriálními prostředky a i dnes, kdy infekčně-toxická teorie již není většinou uznávána, vedou tyto nálezy v praxi nezřídka k doplňování ošetření této dysfunkce (ať již hormonálního nebo jiným způsobem) lokálním ošetřením uteru antibiotiky nebo chemoterapeutiky. Mohli jsme se však přesvědčit, že tato kombinace ve srovnání s případy, u nichž bylo užito pouze ošetření hormonálního, nepřinesla podstatného zlepšení stavu. Naopak i při samotném hormonálním ošetření zanikly příznaky imitující příznaky endometritid.

Za účelem zjištění vztahu bakteriální flóry k cystózní degeneraci Graafových folikulů a zejména k příznakům shodným s příznaky infekčních zánětů endometria jsme provedli bakteriologické vyšetření materiálu z 68 případů této dysfunkce. Shodně s Garmem (1949), Nieberle - Cohrsem (1952) aj. zjistili jsme jen u malého počtu případů zárodky, které bylo možno po jejich určení zařadit mezi více méně fyziologickou flóru hojně se vyskytující v konečných částech vývodných pohlavních a močových cest. V obsahu cyst jsme prakticky nezjistili zárodky. Patogenní zárodky nebyly zjištěny a počet zárodků zjištěných u případů cystózní degenerace byl ve srovnání s výsledky bakteriologických vyšetření sekretů klinicky zdravých a plodných zvířat v četných případech dokonce menší, a to i u těch, u nichž byl zjištěn silný výtok sekretu mukopurulentního vzhledu. Domníváme se, že tento zjev by bylo možno u některých případů vysvětlit estrogeny podmíněnou zvýšenou odolností sliznic genitálu vůči bakteriální infekci (během estrogenní fáze cyklu), o níž bylo referováno více autory (Rowson a spol., 1953, Likar, 1956, Dawson, 1957, aj.). Důkazem lokálního příznivého účinku estrogenu jsou slibné výsledky intrauterinní aplikace při léčbě endometritid (Koch, 1956, Koch a spol., 1955 a 1958).

Proti infekční teorii svědčí již skutečnost, že při infekčních onemocněních genitálu není cystózní degenerace zjišťována. Důkazem neinfekčního původu změn imitujících infekční onemocnění endometria jsou negativní výsledky ošetření uteru antibiotiky nebo jinými antibakteriálními prostředky a úspěchy hormonální terapie, o nichž jsme se shodně s jinými autory přesvědčili. Zdá se tedy oprávněnou domněnka, s níž se ztotožňují Garm (1949), Roberts (1955), Küst - Schaetz (1953) aj., že tyto příznaky jsou vyvolány hormonálním předrážděním endometria estrogeny během jejich vylučování. V naší práci však nechceme poukázat jen na tuto skutečnost, ale na využití tohoto poznatku v praxi, kde je dosud často změněný sekret při cystózní degeneraci považován za exsudát infekčního původu a jako takový léčen. Na základě uvedených poznatků se do-

mníváme, že doplňování hormonálního ošetření takovou terapií je indikováno jen při pozitivním bakteriologickém nálezu, jinak je ve většině případů jen plýtváním antibiotiky.

Souhrn

V práci jsou hodnoceny a diskutovány výsledky klinického, patologicko-anatomického a bakteriologického vyšetření celkem 68 případů cystózní degenerace Graafových folikulů skotu. Postižena byla za známých příznaků nejčastěji zvířata dobrého výživného stavu s vysokou užitkovostí ve stáří 4 až 8 roků (52 %) během prvních měsíců po porodu, a to převážně v zimních nebo jarních měsících (72 %).

Při bakteriologickém vyšetření sekretu odebraného ze zevní branky děložního krčku 25 krav s touto ovariální dysfunkcí bylo shledáno 52 % vzorků sterilních. Vyšetřením sekretu odebraného ze zevní branky děložního krčku 33 krav se zdravým pohlavním ústrojím bylo shledáno 48,4 % vzorků sterilních. Při bakteriologickém vyšetření vzorků sekretu odebraného z dělohy 43 krav s cystózní degenerací Graafových folikulů bylo 60,4 % sterilních. Obsah cystózně degenerovaných folikulů u 36 případů byl shledán v 94,5 % sterilní. Zárodky izolované u ostatních případů bylo možno po jejich určení zařadit mezi druhy často se vyskytující v konečných částech vývodných pohlavních a močových cest. V sekretu odebraném v zevní brance děložního krčku a děloze byly zjištěny v největším počtu mikrokoky — 21 kmenů (*M. candidus*, *flavus*, *epidermidis* — sporadicky *M. ureae*, *luteus* a *freundenreichii*). Z izolovaných 19 kmenů streptokoků šlo v 11 případech o enterokoky (*Str. faecalis*), v osmi případech o viridující streptokoky (*Str. acidominimus*, *bovis* a *equinus*). V počtu 14 kmenů zjištěné difteroidní zárodky byly v sedmi případech určeny jako *Cor. bovis*, jeden kmen se vlastnostmi shodoval s *Cor. renale*, další s *Cor. hoagii*. Zbývajících pět kmenů se svými vlastnostmi neshodovalo se žádným známějším korynebakteriem (blížily se Bergeyem uváděným saprofytním korynebakteriím). Z Gr.-tyčinek z čeledi *Enterobacteriaceae*, izolovaných v počtu 13 kmenů, byla nejhojněji zastoupena *E. coli* (5 kmenů) před *E. freundii* (2 kmeny), *Aerobacter cloacae* (2 kmeny), *Serratia* (2 kmeny), *Alcaligenes faecalis* a jedním blíže neurčeným, blízcím se vlastnostmi *Klebsiellám*. V menším počtu (6 kmenů) byly zjištěny neurčované plísňe a kvasinky nebo saprofytní sporetočné zárodky (5 kmenů) — *B. subtilis*, *B. cereus* var. *mycoides* a dva blíže neurčené.

Je tedy velmi pravděpodobné, že i změny imitující příznaky infekčních záležitostí endometria (výtok sekretu nejčastěji mukopurulentního vzhledu apod.) jsou primárně vyvolány hormonálními poruchami. Nápadně nízký počet izolovaných zárodků by bylo možno u některých případů vysvětlit zvýšenou odolností sliznic genitálu vůči infekci podmíněnou estrogény.

Je poukázáno na využití poznatků v praxi — doplňování hormonálního ošetření cystózní degenerace Graafových folikulů lokálním ošetřením uteru antibiotiky je indikováno jen při pozitivním bakteriologickém nálezu. I při endometritidách provádějících cystózní degeneraci Graafových folikulů má být léčba namířena proti primární, tj. hormonální poruše.

Literatura

1. Benesch F.: Lehrbuch der tierärztlichen Geburtshilfe und Gynäkologie, München, Berlin, Wien 1957. — 2. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Baltimore 1948. — 3. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, Bal-

timore 1957. — 4. Beschlebnov A.: Jalovost' krupnogo rogatogo skota i borba s nej, Moskva 1952. — 5. Dawson F. L. M.: Vet. Rec. 1957, 21. — 6. Dawson F. L. M.: The British Vet. Journ. 1957, 3, 112-133. — 7. Dawson F. L. M.: The British Vet. Journ. 1958, 3, 96-105; 4, 134-141. — 8. Erikson K.: Report of the XIVth. Internat. Vet. Congr. London 1949, Vol. III., 216. — 9. Fincher M. G., Gibbons W. J.: Diseases of cattle, American Veterinary Publications, Inc. Evanston, Illinois 1956. — 10. Fujimoto Y.: Jap. J. Vet. Res. 1956, 129-142; ref. Mon. f. Vet. Med. 1958, 1, 25. — 11. Garm O.: Report of the XIV. Internat. Vet. Congress 1949 London. — 12. Garm O.: Acta Endocrinologica Supplementum 3, Copenhagen 1949, 144; ref. WTM 1950, 445. — 13. Grandschamp G.: Schw. A. f. Tierheilkd. 1953, 672. — 14. Gruber R.: Vet. Diss. München 1952 (cit. podle Dawsona). — 15. Hetzel H.: Die Unfruchtbarkeit der Haussäugetiere, Jena 1940. — 16. Holý L., Kudělka E.: Sborník ČSAZV Veterinární medicína 1958, 8/9, 705-719. — 17. Klobouk A.: Sterilita hovädzieho dobytku, Bratislava 1953. — 18. Koch W., Heim E.: DTW, Fortpfl. Zuchthyg. u. Haustierbes. 1955, 3, 29-30. — 19. Koch W.: Proceedings of the Second World Congress on Fertility and Sterility, Vol. II. Naples 1956, 1266-1271. — 20. Koch W., Beck G., Heim E.: TU 1958, 12, 401-404. — 21. Kraft H.: Mon. f. Vet. Med. 1957, 9, 211. — 22. Küst D., Schaetz F.: Fortpflanzungsstörungen der Haustiere, Stuttgart 1953. — 23. Laing J. A.: Fertility and sterility in the domestic animals, London 1955. — 24. Lesbouyier G.: Bull. de l'Acad. vét. de Fr. 1944, 97, 324. — 25. Likar J. N.: Brit. Vet. J. 1956, 242. — 26. Málek I., Wagner V.: Mikrobiologické vyšetřovací metody a stručná diagnostika v praxi, Praha 1948. — 27. Nieberle K., Cohrs P.: Lehrbuch der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere, Jena 1954. — 28. Nusschag W., Illner F.: Arch. für Experimentelle Veterinärmedizin 1958, 3, 392-409. — 29. Olds cit. podle Finchera a sp. — 30. Přibyl E.: Veterinární gynekologie, Učební texty Praha 1956. — 31. Přibyl E.: Sborník ČSAZV Veterinární medicína 1958, 8/9, 539-547. — 32. Rieck G. W.: DTW 1958, 10, 275-277; 12, 331-333. — 33. Richter J.: Die Sterilität des Rindes, Berlin 1938. — 34. Roberts S. J.: The Cornell Veterinarian 1955, Vol. XLV., 4, 497-513. — 35. Rowson L. E. A., Lamming G. E., Fry R. M.: Vet. Rec. 1953, 65, 333. — 36. Schaetz F.: III. Internat. Congress on Anim. Repr. Cambridge 1956, Pathology. — 37. Schmidt cit. podle Brodaufa H.: DTW 1957, 6, 129. — 38. Sonnenbrodt H., Ranninger J.: Z. Tierzüchtung 1949 (58), 109. — 39. Studenecov A. P.: Veterinarnoje akušerstvo i ginekologija, Moskva 1953. — 40. Täubrich F.: Zentralblatt f. Veterinärmedizin 1958, 4, 373-390. — 41. Vandeplasse M., Paredis F.: ref. Rec. de Med. Vet. 1956, 5, 412. — 42. Yamauchi M.: Bull. Office int. Epizooties 1956, 46, 91-101; ref. Landw. Zentralblatt 1958, 1, Abt. IV., 165.

К вопросу соотношения между бактериальной флорой в половых органах и кистозной дегенерацией фолликул Графа у крупного рогатого скота

В работе оцениваются и обсуждаются результаты клинического патолого-анатомического и бактериологического исследования 68 случаев кистозной дегенерации фолликул Графа у крупного рогатого скота. Поражались — при наличии известных признаков — чаще всего животные в хорошем состоянии упитанности, с высокой продуктивностью, в возрасте 4—8 лет (52 %) в течение первых месяцев после родов, а именно, главным образом в зимние или весенние месяцы (72 %).

При бактериологическом исследовании секрета, взятого с внешних ворот шейки матки 25 коров с нарушением деятельности яичника найдено 52 % стерильных проб. При исследовании секрета, взятого во внешних воротах шейки матки у 33

коров со здоровыми половыми органами, было найдено 48,4 % стерильных проб. При бактериологическом исследовании проб секрета, взятого из матки 43 коров с кистозной дегенерацией фолликул Графа, было стерильных 60,4 %. Содержание кистозно дегенерированных фолликул в 36 случаях в 94,5 % было стерильно. Зародыши, изолированные в остальных случаях, можно было — после их определения — отнести к видам, часто встречающимся в конечных частях выводных половых и мочевых путей. В секрете, взятом во внешних воротах шейки матки и в матке, были установлены в максимальном числе микрококки — 21 штамм (*M. candidus*, *flavus*, *epidermidis*, спорадически — *M. ureae*, *luteus* и *freudenreichii*). Из изолированных 19 штаммов стрептококков в 11 случаях речь шла о энтерококках (*Str. faecalis*), в 8 случаях о стрептококках, окрашивающих питательную среду в зеленый цвет. (*Str. acidominimus*, *bovis* и *equinus*). В числе 14 штаммов установленных дифтероидные зародыши в 7 случаях были определены как *Cor. bovis*, причем один штамм по свойствам походил на *Cor. renale*, дальнейший — на *Cor. hoagii*. Остальные пять штаммов по своим свойствам не походили ни на одну из известных коринебактерий (приближались к приводимым Бергеем сапрофитным коринебактериям). Из Gr. палочек семейства *Enterobacteriaceae*, изолированных в числе 13 штаммов, обильнее всего представлена *E. coli* (5 штаммов), далее *E. freundii*, *Aerobacter cloacae* (2 штамма), *Serratia* (2 штамма), *Alcaligenes faecalis* и одним точно не установленным, по свойствам приближающимся к *Klebsiella*. В меньшем количестве (6 штаммов) были найдены точно неустановленные плесневые грибы и дрожжевые грибки или сапрофитные спорообразующие зародыши (5 штаммов) — *B. subtilis*, *B. cereus* var. *mycoides* и два, точнее не установленные.

Следовательно, весьма вероятно, что и изменения, имитирующие признаки инфекционных воспалений слизистой оболочки матки (выделение секрета чаще всего мукопулентного вида и под.), первично вызываются гормональными нарушениями. Весьма низкое число изолированных зародышей в некоторых случаях можно было бы объяснить повышенной устойчивостью слизистых оболочек половых органов против инфекции, обусловленной эстрогенами.

Обращается внимание, что применение данных на практике — дополнение гормонального исследования кистозной дегенерации фолликул Графа местным исследованием матки антибиотиками допускается только при позитивном бактериологическом диагнозе. И при эндометритах, сопровождающих кистозную дегенерацию фолликул Графа, лечение должно быть направлено против первичного, т. е. гормонального нарушения.

A Contribution to the Question of the Relation of the Bacterial Flora of the Genital Organs to the Cystic Degeneration of the Graaf's follicles in Cattle

In this paper the results of clinical, pathological and bacteriological examinations of 68 cases of cystic degeneration of the Graaf's follicles in cattle are evaluated and discussed. Affected were with the well known symptoms mostly animals in good condition and of high utility, in the age of 4—8 years (52 %) during the first months after delivery, predominantly during the winter or spring months (72 %).

The bacteriological examination of the secrete gained at the orifice of the collum uteri from 25 cows with the mentioned ovarian disorders revealed 52 % of the taken samples as steriles. Of the samples from 33 sound cows 48,4 % were sterile. The bacteriological examination of uterine secrete from 43 cows with cystic degeneration of the Graaf's follicles revealed 60,4 % sterile samples. The content of the cystic degenerated follicles was in 94,5 % of the cases sterile. The microorga-

nisms isolated from the remaining cases could after their identification be classified as such usually found in the urinary and genital ways. The secrete from the collum uteri and uterus contained mostly micrococci — 21 strains (*M. candidus*, *flavus*, *epidermidis*; sporadically *M. ureae*, *luteus* and *freudenreichii*). Among 19 strains of streptococci in 11 cases enterococci were present (*Str. faecalis*), in 8 viridans kinds (*Str. acidominimus*, *bovis* and *equinus*). Among 14 strains of diphtheroid microorganisms in 7 cases *Cor. bovis* were present and one strain was identical with *Cor. renale* and another with *Cor. hoagii*. The remaining 5 strains did not correspond with any of the better known corynebacteria (they were similar to the saprophytic corynebacteria mentioned by Bergey). Among Gr-bacilli of the genus *Enterobacteriaceae* were isolated 13 strains, of which 5 could be identified as *E. coli*, 2 as *E. freundii*, 2 as *Aerobacter cloacae*, 2 as *Serratia*, 1 as *Alcaligenes faecalis* and 1 exactly non determined with the properties of *Klebsiella*. Less frequent were moulds and yeasts (6 strains) or saprophytic sporogenous microorganisms (5 strains — *B. subtilis*, *B. cereus* var. *mycoides*) and 2 could not be exactly determined.

It is therefore very probable, that the changes imitating the symptoms of endometritis (discharge mostly of mucopurulent character) are primarily due to hormonal disorders. The striking small number of isolated microorganisms can be in some cases explained by the greater resistance of the genital mucosa against infection due to the action of the oestrogenes.

Discussed is the exploitation for the practice. The hormonal examination of cystic degeneration of the Graaf's follicles should be combined with a local treatment of the uterus by antibiotics only in cases with positive results of the bacteriological examination. Even in cases of endometritis together with cystic degeneration of the Graaf's follicles the therapy should be directed against the primary hormonal disorder.

Aktivita sérové transaminázy kyseliny glutamové oxaloctové, glutamové pyrohroznové a aldolázy při některých hepatopatiích u koní

Активность серозной трансаминазы кислот глутаминовой оксалукусусной, глутаминовой пировиноградной и альдолазы при некоторых гепатопатиях у лошадей

Die Aktivität der Transaminase der Glutam-Oxalelessigsäure, der Glutam-Pyrotraubensäure und der Aldolase im Serum bei einigen Hepatopathien der Pferde

MVDr. Jaroslav KONRÁD

Z krajské veterinární nemocnice v Českých Budějovicích

Technická spolupráce J. Vyhlička

Došlo dne 23. I. 1960

Úvod

Využití novodobých znalostí biochemismu enzymatických pochodů v praktické klinické diagnostice vyzvedlo do popředí některé enzymy, které vykazují zvlášť labilní aktivitu za různých patologických stavů.

Humánní biochemické i klinické laboratoře věnují v posledních několika letech především zvýšenou pozornost aktivitě aldoláz a zvláště pak transamináz, a to transamináze kyseliny glutamové oxaloctové — GOT a kyseliny glutamové pyrohroznové — GPT.

Největší význam jejich využití je zatím přikládán hlavně v diagnostice jaterních chorob a patofyziologických stavů myokardu. Karmen, Wroblewski, La Due (14), La Due, Wroblewski (16), Steinberg, Ostrow (18), Chinsky, Shmagranoff, Sherry (19), De Ritis, Coltari, Giusti (8). Toto současné klinické využití však nikterak neomezuje jejich širší diagnostické možnosti, což dokazují i další práce, sledující aktivitu transamináz při ostatních onemocněních i v rozličných orgánech a tekutinách tělních; Cohen, Herkhuis (7), Wroblewski, La Due (24).

U nás se zabývali problematikou těchto enzymů z klinického hlediska Turský, Bielik (23), Ševela (19, 20), Bobek a spol. (1).

Od prvního popisu enzymatické transaminace Braunsteinem a Kricmanovou (2) v roce 1937, byla její charakteristika později popsána v celé řadě prací výše uvedených autorů a z těchto důvodů není zde také opětne rozváděna.

Práci, zabývajících se problematikou sledování aktivity těchto enzymů u zvířat, není příliš mnoho. Hodnoty normálních aldoláz v séru koní (10–46) uvádí *Bruns* (3, 5), transamináz v séru psů *Ševela*. Na našich veterinárních pracovištích se zabývá možností využití těchto vyšetřovacích postupů současně několik laboratoří. Normální hodnoty aktivity transamináz a aldoláz i některých dalších enzymů v určitých tkáních i tekutinách u koní uvádí *Šlesinger* (21), transamináz u koní se zdravými játry *Horák, Jícha a Sova* (10). Aktivity transamináz a aldoláz při určitých chorobných stavech psů všímá si rovněž *Šlesinger* (22).

Ve své práci podáváme naše první výsledky, týkající se hodnot aktivity transamináz a aldoláz při některých hepatopathiích u koní, především pak u hypertrofických cirhóz, s nimiž jsme se zatím v literatuře nesetkali.

Pracovní postup

Zjišťování aktivity transaminázy kyseliny glutamové oxaloctové — GOT a kyseliny glutamové pyrohroznové — GPT bylo prováděno klasickou metodou popsanou *Reitmanem a Franklem* (17). K vyhodnocování bylo použito Fulrichova fotometru. Aktivita aldolázy byla určována metodou podle *Brunse a Pulse* (4) na podkladě stanovení triosofosfátu, vzniklého štěpením fruktózo-1,6-difosfátu, které po převedení na hydratony dávají v alkalickém prostředí barevnou reakci, využitelnou ke kolorimetrickému vyhodnocování (*Horejší a spol.*, 11). Výsledky aktivity enzymů jsou uváděny v jednotkách jak je běžně cituje domácí i zahraniční literatura (*K. j.*).

Sérum bylo získáváno z krevních odběrů z *vena jugularis* a po retrakci a stažení uchovávalo v lednici. Tím bylo zamezeno kolísání aktivity jednotlivých enzymů, kterou uchování séra v lednici neovlivňuje ani po dobu dvou týdnů (*Karmen a spol.*, 14).

Krevní vzorky byly odebírány od koní různého stáří i pohlaví. Ke stanovení normálních hodnot od zvířat klinicky zdravých byly vzorky krve odebírány od koní, pocházejících z farem státního plemenářského statku.

Stav aktivity jednotlivých enzymů u nemocných zvířat byl současně srovnáván s histologickými nálezy jaterních vzorků, získaných biopsií. Tato šetření měla stejný postup jak byl uveden již v předcházejících pracích (*Konrád*, 15). Výsledky histologických nálezů jsou zachyceny v příslušných tabulkách u jednotlivých pacientů.

Kontrola výsledků aktivity transamináz a aldoláz byla ověřována v Ústředních laboratořích KÚNZ v Českých Budějovicích — primář MUDr. *Vyhnanek*, kterému také touto cestou děkujeme za laskavé umožnění uskutečnění našich sledování a přenechání náročnějších reagensů.

Výsledky a diskuse

Sledovali jsme aktivitu transaminázy kyseliny glutamové oxaloctové a kyseliny glutamové pyrohroznové za současného ověřování aktivity aldoláz u koní.

Hodnoty byly získány celkem od 46 koní, z čehož v 27 případech šlo o klinicky zdravé jedince, ve 14 případech o koně stížené hypertrofickou cirhózou v průběhu žďárské choroby a v pěti případech o akutní hepatopatie, různé etiologie.

Dosažené výsledky nám umožnily srovnání hodnot naměřených jak u zdravých jedinců, tak i při těchto jednotlivých patologických stavech jaterního parenchymu.

Námi získané výsledky aktivity aldolázy u klinicky zdravých koní se vcelku shodují s hodnotami, které u koní naměřil *Bruns*.

Hodnoty GPT blíží se výsledkům dosaženým *Šlesingrem* a *Továrkem* (21), stejně jako výsledkům uvedených *Horákem* a spol. (10), třebaže v prvním případě se pohybují v průměru níže. Hodnoty GOT jsou sice podstatně vyšší proti uvedeným autorům (21), nedosahují však takové výše, jakou uvádí *Horák* a spol., kteří je zaznamenali použitím metody podle *Wroblewského* a spol. (6, 26).

Při porovnání dosažených výsledků našich vlastních případů jsme zaznamenali podstatné výkyvy v hodnotách transaminázové reakce jak při akutních procesech jaterních, tak v menší míře i při cirhotických stavech, což se shoduje s řadou literárních údajů z humánní medicíny (1, 8, 13, 14, 23), i s údaji *Šlesingerových*, který zjistil výrazně zvýšenou aktivitu, zvláště GPT u psů, jimž aplikoval CCl_4 . Podobných výsledků s aplikací chloridu uhličitého u kryš dosáhl *Friend* a spol. (9).

Výsledky z našich pěti akutních případů hepatopatií vykazují zvýšenou aktivitu GPT v průměru pětkrát a v největší extrémní hodnotě až třináctkrát, u GOT v extrémních hodnotách pouze dvakrát.

Poměrně menší výkyvy jsme našli při hodnocení aktivity transamináz u cirhotických stavů. Shodně s literárními údaji (1, 13, 14, 25) se také v našich případech zvyšovala aktivita GOT (v průměru o 11,8 %), zatímco GPT si udržovaly téměř stabilní hodnoty v mezích normálů, v průměru pak byly zcela nepatrně sníženy (2,1 j.). Tyto nálezy potvrzují i názory o vztahu aktivity GOT k protražovaným chorobným afekcím. *Šlesinger* (22) zaznamenal u koní zvýšenou aktivitu GOT i po aplikaci CCl_4 a jen nepatrné zvýšení aktivity GPT.

Pozitivní reakci aldolázovou zjistili jsme rovněž při námi sledovaných akutních procesech jaterních až do 42 % v průměru proti našim normálům, zatímco u jaterních fibróz aktivita aldolázy značně klesala (– 14 j.). *Hořejší* (12) nepovažuje aldolázový test za specifický pro infekční hepatitidu u lidí, neboť pozitivní výsledky dává i chronická hepatitis.

Kromě výsledků *Šlesingro-*

I. Aktivita transamináz — GOT — GPT a aldoláz u klinicky zdravých koní

Č. p.	Transaminázy		Aldolázy
	GOT	GPT	
1	50	6	27
2	65	10	26
3	50	4	20
4	54	4	20
5	60	4	22
6	57	6	20
7	54	4	19
8	50	4	17
9	60	4	18
10	54	2	18
11	54	2	23
12	50	4	19
13	57	2	17
14	60	6	22
15	54	6	19
16	62	6	28
17	65	4	24
18	60	6	20
19	60	4	28
20	50	4	—
21	80	10	42
22	68	6	49
23	66	4	39
24	66	6	32
25	74	4	37
26	66	6	42
27	56	8	43
Průměr	59,3	4,9	26,5

II. Aktivita transamináz – GOT – GPT a aldoláz při hypertrofických cirhózách jater

Č. p.	Transaminázy		Aldolázy	Histologický nález
	GOT	GPT		
1	46	4	8	<i>Fibrosis hepatis</i> žďárkového typu
2	52	2	7	
3	60	2	11	
4	57	6	11	
5	68	4	11	
6	89	2	22	
7	62	2	7	
8	92	2	21	
9	80	2	10	
10	57	2	7	
11	—	—	11	
12	—	—	10	
13	—	—	13	
14	—	—	23	
Průměr	66,3	2,8	12,5	

III. Aktivita transamináz – GOT – GPT a aldoláz při akutních procesech jaterních

Č. p.	Transaminázy		Aldolázy	Histologický nález
	GOT	GPT		
1	122	21	—	enzootická <i>hepatitis</i> s centroacinózní nekro- biózou
2	80	6	34	subakutní enzooot. <i>hepatitis</i>
3	80	10	43	enzoot. <i>hepatitis</i>
4	104	14	12	enzoot. <i>hepatitis</i>
5	86	68	62	kl. n.: <i>ikterus gravis</i>
Průměr	94	23,8	37,8	

v ý c h (22) nemůžeme blíže konfrontovat výchyly, pokud jde o zjištěné hodnoty u koní zdravých a u koní s patologickými stavy jaterními, neboť jsme v dostupné literatuře nenašli údaje, které by si všimaly této problematiky vzhledem k patologii jater u koní.

Získané výsledky aktivit transamináz i aldoláz u klinicky zdravých koní a u koní stížených některými hepatopatiemi a jejich vzájemné, i když zatím jen orientační srovnání, mluví shodně se Šlesingrem pro jejich zavedení a další zpracování i ve veterinární klinicko-laboratorní diagnostice, zvláště v patologii jater u domácích zvířat.

Jejich význam bude zvláště důležitý při sledování dynamiky patologického stavu jaterního parenchymu a vzhledem ke stabilitě jejich aktivit, i pro odkrývání initiačních stadií, podobně jako je tomu v humánní diagnostice a prognostice.

Dosavadní rozdílnost v hodnotách zvířat jak zdravých jedinců, tak i u patologických případů vyžaduje zavedení jednotného postupu a hodnocení, aby výsledky mohly být objektivně vyhodnocovatelné nejen na příslušném pracovišti, ale dobře reprodukovatelné a srovnatelné i s výsledky dalších veterinárních pracovišť. Vzhledem k poměrně nízkým hodnotám GOT u koní rozpracováváme reakci s postupným ředěním séra.

Podstatnou důležitost ve veterinární medicíně hraje doba trvání chorobného procesu, která velmi často není přesně známa, což se také značně projeví na aktivitě těchto enzymů a tím i těžkosti konfrontování jednotlivých výsledků, třebaže u stejných diagnóz, avšak v jejich různém dynamickém sledu.

Dosavadní zkušenosti vyžadují sledování těchto enzymatických testů především z hlediska dynamické diagnostiky a prognostiky za současných přesných nálezů klinických a podle možnosti i dalších nálezů laboratorních, zvláště údajů histopatologických.

Souhrn

Byla sledována aktivita transaminázy kyseliny glutamové oxalacetové — GOT, kyseliny glutamové pyrohroznové — GPT za současného ověření aldolázového testu celkem u 46 koní.

Naměřené hladiny týkaly se 27 klinicky zdravých jedinců, pěti případů akutních hepatopatií různé etiologie a čtrnácti případů hypertrofických cirhóz v průběhu žlázní choroby.

Jsou uváděny srovnávací výsledky mezi zjištěnými normálními hodnotami zdravých koní a výsledky získanými při akutních afekcích a fibrozách jater.

V článku se diskutuje o významu zavádění těchto vyšetřovacích postupů do veterinární diagnostiky, zvláště pokud jde o sledování dynamiky procesu a důležitost zavedení jednotného vyšetřovacího postupu a hodnocení.

Literatura

1. Bobek K., Petera V., Láhn V., Jindra J., Karlíček V.: Č. L. Č. 96, 51, 1571, 1957. — 2. Braustein A., Kritzman M.: Enzymologia 2, 129, 1937. — 3. Bruns F.: Biochem. Zft. 325, 156, 1953/54. — 4. Bruns F., Puls W.: Klin. Wschr. 27-28, 656, 1954. — 5. Bruns F.: Clinica Chimica Acta, 2, 257, 1957. — 6. Cabaud P., Leeper R., Wroblewski F.: Am. J. clin. Pathol. 26, 1101, 1956. — 7. Cohen P., Herkhuis G.: Jour. Biol. Chem. 140, 711, 1941. — 8. De Ritis F., Coltori M., Giusti G.: Minerva Medica 47, 1, 1956. — 9. Friend C., Wroblewski F., La Due J.: J. exp. Med. 102, 699, 1955. — 10. Horák M., Jícha J., Sova Z.: ČSAZV-Veter. med. 31, 12, 961, 1959. — 11. Hořejší J., Kana drač M., Michalec Č., Slavík K.: Základy chemického vyšetřování v lékařství, Praha, 1957. — 12. Hořejší J., Mirčevová L., Soušek R., Vaněček K.: Vnitřní lékařství, 3, 7, 580, 1957. — 13. Chinsky M., Shmagranoff M., Sherry M.: Jour. of labor. and clin. med. 47, 1, 108, 1956. — 14. Karmen A., Wroblewski F., La Due J.: Jour. of Clin. Investigation 34, 126, 1955. — 15. Konrád J.: ČSAZV-Veter. med. 32, 5, 395, 1959. — 16. La Due J., Wroblewski F.: Circulation 11, 871, 1955. — 17. Reitman S., Frankel S.: Am. J. clin. Pathol. 28, 56, 1957. — 18. Steinberg D., Ostrow B.: Proceedings of the Society forexper.

biology and med. 89, 1, 31, 1955. — 19. Ševela M.: Scripta med. 29, 185, 1956. — 20. Ševela M.: Vnitřní lékařství, 8, 721, 1958. — 21. Šlesinger L., Továrek J.: Veter. časopis, 8, 6, 583, 1959. — 22. Šlesinger L.: ČSAZV-Veter. med. 31, 12, 949, 1959. — 23. Turský T., Bielik E.: Brat. lékař. listy, 36, 404, 1956. — 24. Wroblewski F., La Due J.: Proceedings of the Society for exp. biol. and med. 90, 210, 1955. — 25. Wroblewski F., La Due J.: Proceedings of the Society for exp. biol. and med. 91, 4, 569, 1956. — 26. Wroblewski F., Cabaud R.: Am. J. clin. Pathol. 27, 235, 1957.

Активность серозной трансаминазы кислот глутаминовой оксалукусной, глутаминовой пировиноградной и альдолазы при некоторых гепатопатиях у лошадей

Изучалась активность трансаминазы глутаминовой оксалукусной кислоты ГОК, глутаминовой пировиноградной кислоты — ГПК при одновременной проверке альдолазного теста всего у 46 лошадей.

Замеренные уровни относились к 27 клинически здоровым особям, в пяти случаях к особям с острым заболеванием гепатопатией разной этиологии и в четырнадцать случаев — с гипертрофическим циррозом в процессе жидарской болезни.

Приводятся результаты сравнения между установленными нормальными величинами у здоровых лошадей и результатами, полученными при острых аффекциях и фиброзах печени.

Приводятся дискуссии по вопросу значения введения этих приемов исследования в ветеринарную диагностику, особенно поскольку речь идет об изучении динамики процесса и важности внедрения единого приема исследования и оценки.

Die Aktivität der Transaminase der Glutam-Oxalessigsäure, der Glutam-Pyrotraubensäure und der Aldolase im Serum bei einigen Hepatopathien der Pferde

Verfolgt wurde die Aktivität der Transaminase der Glutam-Oxalessigsäure (GOT) und der Glutam-Pyrotraubensäure (CPT) bei gleichzeitiger Prüfung des Aldolasetests insgesamt bei 46 Pferden.

Die ermittelten Werte betrafen 27 klinisch gesunde Tiere, 5 Fälle von akuten Hepatopathien verschiedener Ätiologie und 14 Fälle von hypertrophischen Zirrhosen im Verlaufe der Zđärer Krankheit.

Es werden die vergleichenden Ergebnisse der Befunde bei gesunden Tieren und der bei akuten Affektionen und bei fibrösen Leberaffektionen ermittelten Werte angeführt.

Besprochen wird die Bedeutung einer Einführung dieser Untersuchungsmethoden in die Veterinärdiagnostik, insbesondere bei Verfolgung der Dynamik des Prozesses, und die Notwendigkeit eines einheitlichen Untersuchungsvorgangs und einer einheitlichen Bewertung.

Použití perlového testu v diagnostice *Bacillus anthracis*

Применение жемчужного теста в диагностике сибирской язвы
(*Bacillus anthracis*)

Anwendung des Perltests in der Diagnostik des *Bacillus anthracis*

Vladimír PLEVA, Richard HARNACH a Ernest MESÁROŠ

Výzkumný ústav veterinární, oddělení mikrobiologie a virologie v Brně, ČSAZV, Brno,
vedoucí oddělení prof. dr. R. Harnach, doktor veterinárních věd

Došlo dne 22. VII. 1959

Úvod

Při práci (Harnach, Mesároš, Pleva, 1959), ve které jsme zkoušeli citlivost 66 kmenů *B. anthracis* vůči penicilínu, jsme zjistili některé kmeny s dosti značnou resistencí.

Gustafson a Svehag (1956) popisují případ, kdy ze 44 kmenů *B. anthracis* 43 vykazovalo citlivost vůči penicilínu v rozmezí 0,01–01 jednotek/ml půdy, při čemž u nich diagnosticky „perlový test“ vyzněl kladně, zatímco jeden kmen, který byl vůči penicilínu méně citlivý, a to v rozsahu 4 až 12 m. j./ml, nevytvořil typické morfologické změny „šňůry perel“ v žádné koncentraci penicilínu. „Perlový test“ (Perlschnurtest) zavedli do diagnostiky anthraxu Jensen a Kleemeyer (1953). Test spočívá v tom, že anthraxové bacily vytvářejí v půdách s nízkým obsahem penicilínu (nejlépe 0,05 m. j./ml) řetězce podobné šňůrám perel. Kmeny antrakoidních bacilů nejsou citlivé k penicilínu a nevytvářejí perlové změny. Podle Weidenmüllera (1956), který zkoušel různé metody pro diagnostiku anthraxu, je k diagnostice nejvhodnější právě „perlový test“.

Jensen a Kleemeyer (1953) provedli pro diferenciální diagnostiku 11 zkoušek u *Bacila anthracis* (50 kmenů) a aerobních sporotvorných bacilů (43 kmenů). Použili tyto zkoušky:

tvár kolonií na agaru,	růst v želatině,
tvár jednotlivých bacilů a jejich	hemolýzu na krevním agaru,
uspořádání,	fermentaci dextrózy a sacharózy,
barvení podle Grama,	patogenitu pro myši a morče,
pohyblivost,	termoprecipitační Ascoliho reakci,
růst v bujónu,	perlový test.

Tito autoři zjistili, že pro diferenciální diagnostiku *Bac. anthracis* a ostatních aerobních sporotvorných bacilů jsou jen dvě vlastnosti dostatečně odlišné u obou

skupin a nepřekrývají se. Je to způsob růstu v želatině a tvoření perel po působení penicilínu. Autoři uvádějí, že jeden kmen *Bac. anthracis*, nezahrnutý do těchto pokusů (mutanta apatogenní, atypická a nepohyblivá), netvořil typické penicilínové změny.

Diferenciální diagnostikou *Bac. anthracis* se podrobně zabýval Seidel (1954 až 1958), který závěrem pro dnešní možnosti diagnostiky doporučuje při vyšetřování materiálu provádět tyto zkoušky: barvení mikroskopických preparátů (Gram, Giemsa), pokus na zvířeti (očkování dvou myší), sérologické vyšetření (Ascoli), kultivaci na 5% krevním agaru, 2% MPA a MP bujón, odbarvování prontosilu, fágový test, žloutkovou plotnu, pohyblivost zkoušenou na 0,75% agaru na plotně a v U-rourkách s 0,2% agarem, penicilínovou plotnu 10 m. j./ml a „perlový test“. K použití „perlového testu“ poznamenává, že je to metodika nebezpečná a mimo to, že jak u plotny s 10 m. j. penicilínu/ml, tak i u „perlového testu“ je možnost výskytu penicilínorezistentních kmenů, což jsou zatím jen ojedinělé případy, je však možné, že to v budoucnu bude častější.

Ivanovics a Foldes (1958) popisují obtíže při diferenciální diagnostice *B. anthracis* a *B. cereus* a docházejí k závěru, že buněčná morfolgie, tvar kolonií, pohyblivost a virulence nedostačují pro diferenciaci. Pro rozlišení jsou podle nich nejvhodnější zkoušky tři vlastností, a to produkce fosfatázy, specifické fázové receptory a citlivost k penicilínu. *B. cereus* má silně vyvinutý fosfatázový systém (enzymy štěpící lecithin), tvoří hemolýzu a vykazuje penicilínázovou aktivitu, což umožňuje diferenciální diagnostiku proti *B. anthracis*. Diagnózu dále podporují specifické fágové receptory u *Bac. anthracis*, které chybějí *B. cereus*.

Nižnánský (1958) doporučuje pro diagnostiku anthraxu preparát (Gram, Giemsa), Ascoliho reakci, posouzení růstu na agaru, v bujónu a v želatině a test podle Kujumgiefa (odbarvování prontosilu). Doporučuje v našich laboratořích prověřit Jensen-Kleemeyerův test.

Proto nás zajímalo, jak se budou chovat v „perlovém testu“ kmeny *B. anthracis* naší sbírky, z nichž některé jsou rezistentnější vůči penicilínu (Harnach, Mesároš, Pleva, 1958), než jak uvádí Gustafson a Svehaug (1956). Současně jsme si vzali za úkol porovnat některé další doporučované diagnostické zkoušky.

Materiál

Ke zkouškám jsme použili 67 kmenů *Bac. anthracis*, zachycených v diagnostických ústavech (SVVÚ) v naší republice, odkud nám byly dodány. Kmeny jsme uchovávali ve zkumavkách na šikmých agarrech. Kmeny sporogenních aerobních bacilů v počtu 49 byly izolovány ze sena, prachu, půdy, z krmivových směsí, koření, uzenin a marinovaných ryb.

Metodika

Provedení „perlového testu“

Pro zkoušení metodiky byly připravovány 24hodinové kultury na krevním agaru. Tyto byly očkovány do MP bujónu a tři hodiny inkubovány. Pro test byly 24 hodin předem připraveny tři agarové plotny, jedna bez penicilínu, druhá

s obsahem 0,05 m. j./procaín penicilínu G a třetí s 0,5 j. penicilínu na 1 ml půdy. Na sterilní podložní skla byla pak kladena kolečka vyřezaná sterilním korkovým vrtem z výše popsaných ploten bez penicilínu, s 0,05 a 0,5 m. j. procaín penicilínu na 1 ml. Kolečka agaru byla očkována tříhodinovou bujónovou kulturou a podložní skla byla vložena do sterilních Petriho misek a inkubována v termostatu tři hodiny při 37° C. Pak bylo mikroskopováno pomocí fázového kontrastu s objektivy 10×, 20× a 40× za použití okuláru 10×.

Protože při předběžné zkoušce (s použitím původní metodiky) vyzněl test u některých kmenů nepřesvědčivě, snad vlivem tenké vrstvy agaru a vysychání, rozhodli jsme se provést test na vyšších vrstvách agaru, asi 2 až 3 mm, přímo v Petriho miskách. Provedení testu v miskách: agar se vylévá na tři Petriho misky (bez penicilínu, s 0,05 m. j./ml a 0,5 m. j./ml). Tužkou se plotna rozdělí na dně na osm kruhových výsečí, zaznamenávají se čísla kmenů a kroužkem se označí místo pro nanesení bujónu kličkou. Po očkování necháváme plotny asi 10 minut zaschnout a pak se inkubují dnem (agarem) vzhůru v termostatu tři hodiny při 37° C. Mikroskopování bylo prováděno na nezakrytých koloniích po odklopení víčka, s objektivy 10×, 20× a případně po přikrytí krycím sklem objektivy 40× a imersí. Dobré možnosti posouzení skýtalo i prohlížení růstu na uzavřených Petriho miskách, při položení dnem (agarem) vzhůru na stolek mikroskopu. Rozlišitelnost při okuláru 10× je již dobře možná a pro detailní prohlédnutí použijeme objektiv 20×. Při tomto způsobu je nutno místo fázového zařízení se spokojit s úpravou osvětlení zatažením clonky světelného zdroje a snížením kondenzoru, případně úpravou numerické apertury kondenzoru prstencem u Lumipanu.

Pro diagnostiku antrakoidních kmenů byly použity zkoušky podle B e r g e y e (1957): kultivace na glukózovém agaru, s následujícím barvením Gramem, měření průměru tyčinek, tvorba kyseliny v půdě s manitem a amoniakálními solemi, růst na sojovém agaru, růst v bujónu se 7% NaCl, růst v glukózovém bujónu anaerobně, tvorba plynu v bujónu s NO₃.

Z doporučených metod (viz literární úvod) pro diferenciální diagnostiku bylo použito zkoušek, které daly výsledky, jak je uváděno v tabulce:

1. posouzení 24- a 48hodinových kultur na agaru,
2. mikroskopický preparát z agaru, barvený Gramem,
3. růst v bujónu,
4. mikroskopický preparát z bujónu, barvený Gramem,
5. hemolýza na krevním agaru,
6. pohyblivost a) zkoušena v U-rourkách s 0,2% agarem,
b) na plotnách s 0,75% agarem,
7. růst v želatině (vpich),
8. žloutková plotna — tvorba precipitačních zón,
9. odbarvování prontosilu (Kujumgiefův test),
10. pokus na zvířeti a kultivace ze sleziny uhynulé myšky,
11. Ascoliho reakce,
12. růst při 10 m. j. penicilínu/ml,
13. perlový test.

Jako výchozí materiál pro všechny uvedené zkoušky byly používány kmeny čerstvě vyočkované na krevní agar po 24 hodinách inkubaci při 37° C.

V ý s l e d k y

A. Vlastností antrakoidních kmenů

Všech 40 zkoušených kmenů antrakoidních bacilů roste dobře na MP i glukózovém agaru, kde vytvářejí spory. Jejich cytoplazma se po Gramově barvení jeví vakuolizována. Všechny kmeny jsou grampozitivní a průměr tyčinek je větší než $0,9 \mu$. V půdě s fosforečnanem amonným jako zdrojem dusíku nevytvářejí kyselinu z manitolu. Redukují dusičnany s výjimkou jednoho kmene. Kmeny rostou dobře v glukózovém bujónu za anerobních podmínek, přičemž 37 kmenů vytváří zákal, později se značným sedimentem, zatímco tři kmeny ponechávají bujón čirý za tvorby značného sedimentu. Na sójovém agaru neroste pět kmenů, 10 kmenů roste velmi slabě, sedm kmenů slabě a 18 kmenů roste dobře. Kmeny rostou v bujónu se 7% soli (viz tabulku I).

Podle biochemických a kulturálních vlastností těchto 40 kmenů antrakoidních bacilů jde převážně o *B. cereus*.

B. Metody pro diferenciální diagnostiku

1. Při posuzování kolonií na agaru bylo z 67 kmenů *B. anthracis* nalezeno 31, které vytvářely meduzovité výběžky z okrajů kolonie; 13 kmenů mělo okraje kolonie zoubkované a 23 kmenů okraje hladké. U antrakoidních kmenů vytvářelo 23 kmenů kolonie s okraji meduzovitými, 11 kmenů se zoubkovaným okrajem a šest kmenů s hladkým okrajem. Byla zde u mnoha kmenů morfologická podobnost s *Bac. anthracis*.

2. Preparát z kolonií vyrostlých na agaru má typický obraz řetízkovitého uspořádání bacilů antrakových i antrakoidních. Podle Grama se barví pozitivně kmeny obou skupin.

3. Bujón s naočkovanými kmeny antrakovými byl čirý a 66 kmenů vytvářelo typický vatovitý sediment. Pouze u jednoho kmene byl vatovitý sediment méně typicky vyvinut (hrudky). Všech 40 zkoušených antrakoidních kmenů vytvářelo silný zákal v bujónu.

4. Preparát z bujónových kultur antrakových i antrakoidních kmenů ukazoval řetízkovité uspořádání bacilů.

I. Vlastnosti zkoušených antrakoidních kmenů

Kolonie na MP agaru:	okraj meduzovitý	23 kmenů
	okraj zoubkovaný	11 „
	okraj hladký	6 „
glukózový agar:	růst stejný nebo lepší než na MP agaru	40 „
sojový agar:	neroste	5 „
	velmi slabě roste	10 „
	slabě roste	7 „
	dobře roste	18 „
glukózový bujón (anaerobně)	roste	40 „
	z toho zákal	37 kmenů
	bujón čirý + sediment	3 kmeny
kyselina z manitolu:	negativní	40 „
redukce NO ₃ :	pozitivní, s plynem	39 „
	negativní	1 „
růst v bujónu se 7 % NaCl:		
	pozitivní	40 „

II. Přehled diferenciálních zkoušek

		B. anthracis ze		Antrakoidní ze	
		kmenů:		kmenů:	
1. okraje kolonie na agaru:	meduzovitý zoubkovaný hladký	31 13 23	meduzovitý zoubkovaný hladký	23 11 6	
2. preparát z kolonie:	řetízkový růst	67	řetízkový růst	40	
3. růst v bujonu:	bujon čirý — vatovitý sediment slaběji vatovitý	66 1	zákal	40	
4. preparát z bujonu:	řetízkový růst	67	řetízkový růst	40	
5. hemolýza:	negativní	67	pozitivní	40	
6. pohyblivost: U-rourky agar 0,75 %	negativní negativní	67 67	pozitivní pozitivní	40 40	
7. typický růst v želatině:	typický stroměčkovitý	67	zkapalnilo želatinu	40	
za hod.					
8. aktivita lecitinázy:	krémový precipitát v okolí kolonie	24 48 72	— 1 3	24	40
9. odbarvování prontosilu:	za 1 den za 2 dny za 3 dny za 4 dny za 5 dní za 6 dní za 7 dní za 8 dní za 9 dní za 9 dní neodbarv. částečně	— — — — 1 9 16 11 8 17 5	za 1 den za 2 dny za 3 dny za 4 dny za 5 dní za 6 dní za 7 dní za 8 dní za 9 dní část odb.	3 19 11 1 3 — — — 3	
10. pokus na zvířeti (2 myši):	za 1 den uhynuly obě za 1 den uhynula 1 za 2 dny uhynula druhá za 2 dny uhynuly obě za 2 dny uhynula 1 živá 1 po dvou dnech obě živé (utraceny)	45 14 5 5 1 1 2	za 1 den uhynuly obě za 1 den uhynula 1 za 2 dny uhynula druhá za 1 den uhynula jedna druhá žije za 2 dny uhynula jedna druhá žije	6 1 10 1	
11. Ascoliho reakce:	pozitivní (sérum čs.)	67			
12. Růst při 10 j. penicilínu ml:	negativní pozitivní	52 15	pozitivní	40	
13. perlový test:	pozitivní	67	negativní (úplně beze změn združení tyčinek 3).	40	

5. Růst na krevním agaru byl u antrakových kmenů po 24 až 48 hodinách inkubace bez hemolýzy, teprve po několika dnech při uložení v lednici vytvářelo 10 kmenů viridaci. Všechny 40 antrakoidních kmenů vytvářelo již během několika hodin hemolýzu, která byla po 24 hodinách zřetelná jako jasná zóna.

6. Zkouška na pohyblivost u antrakových kmenů vyzněla negativně jak při kultivaci na 0,75 % agarové plotně (obrázek 1), tak i v U-rourkách s 0,2 % aga-

rem, kde byl růst jen v místě vpichu. U antrakoidních kmenů byla zkouška na pohyblivost pozitivní v obou testech (obrázek 2).

7. Při provedení vpichu do želatiny všechny antrakové kmeny vytvářely typický růst ve tvaru obrácené jedle bez zkapalnění, zatímco u všech kmenů antrakoidních došlo ke zkapalnění želatiny.

8. K nápadnému rozlišení kmenů *Bac. anthracis* a antrakoidních došlo při kultivaci na žloutkový agar. Velmi výrazná precipitační zóna krémové barvy v okolí kolonie byla způsobena lecithinásou antrakoidních bacilů již za 24 hodin (obrázek 3), zatímco u jediného antraxového kmene byla úzká zóna za 48 hodin a u 15 kmenů až za 72 hodin (obrázek 4).

9. K odbarvování prontosisu (viz tabulku II) došlo u prvního antrakového kmene až pátý den, šestý den odbarvilo protosil devět kmenů, sedmý den 16 (tj. maximum), osmý den 11, devátý den osm, při čemž devátý den zůstal prontosil neodbarven u 17 kmenů a u pěti bylo odbarvení částečné (oranžová barva.)

Mnohem rychleji proběhlo odbarvení u většiny antrakoidních kmenů, a to pátý den odbarvilo prontosil úplně již 37 kmenů (ze 40). Začátek odbarvování nastává již za 24 hodin, kdy byly odbarveny bujóny u tří kmenů, maximum odbarvování je za dva dny (19 kmenů), třetí den odbarvilo bujón 11 kmenů, čtvrtý den jeden kmen a pátý den tři kmeny. Tři zbývající kmeny vykazovaly devátý den částečné odbarvení.

10. Při zkoušce patogenity z očkovaných dvou myši uhynuly u antrakových 45 kmenů obě myši za jeden den, u 14 kmenů uhynula za jeden den jedna myš a druhý den druhá myš, u pěti kmenů za dva dny uhynuly obě myši, u jednoho kmene za dva dny jedna myš uhynula a jedna zůstala živá. U dvou kmenů po dvou dnech zůstaly obě myši živé (byly usmrceny za příznaků onemocnění). Ze všech myši byl po provedené pitvě a kultivaci ze sleziny zachycen *B. anthracis*.

U antrakoidních kmenů:

za 1 den uhynuly obě myši u šesti kmenů,

za 1 den uhynula jedna myš a druhý den druhá u jednoho kmene,

za 1 den uhynula jedna myš, druhá zůstala živá u 10 kmenů,

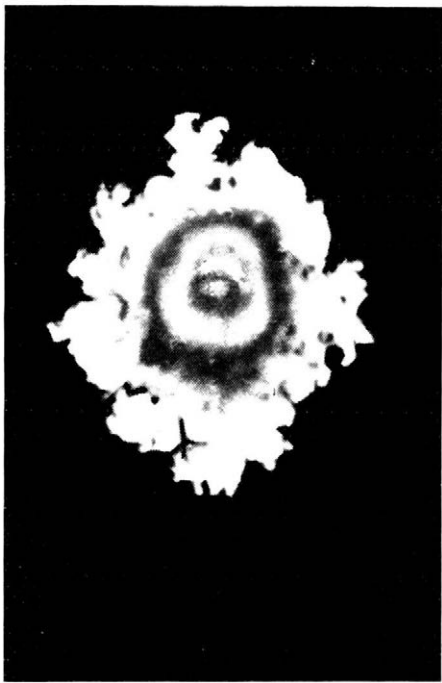
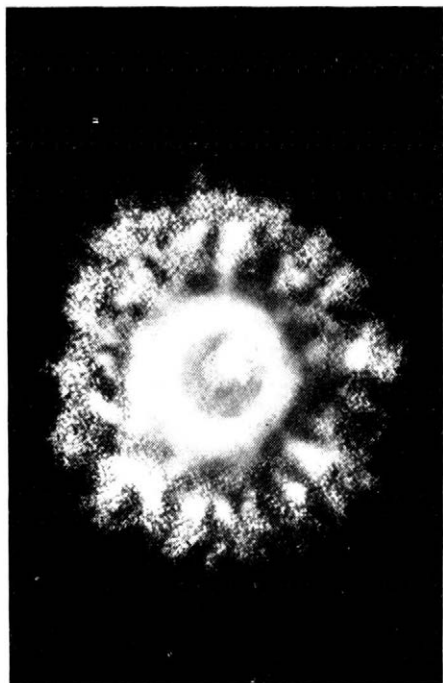
za 2 dny uhynula jedna myš, druhá zůstala živá u jednoho kmene.

11. Termoprecipitační Ascoliho reakce vyzněla u všech 67 kmenů kladně při použití séra čs. výroby. U zkoušeného čínského séra byly vedle 65 pozitivních výsledků dva dubiozní. Německé sérum bylo zkoušeno jen u 44 kmenů, dávalo pozitivní výsledky u 38, dubiozní u čtyř a negativní u dvou.

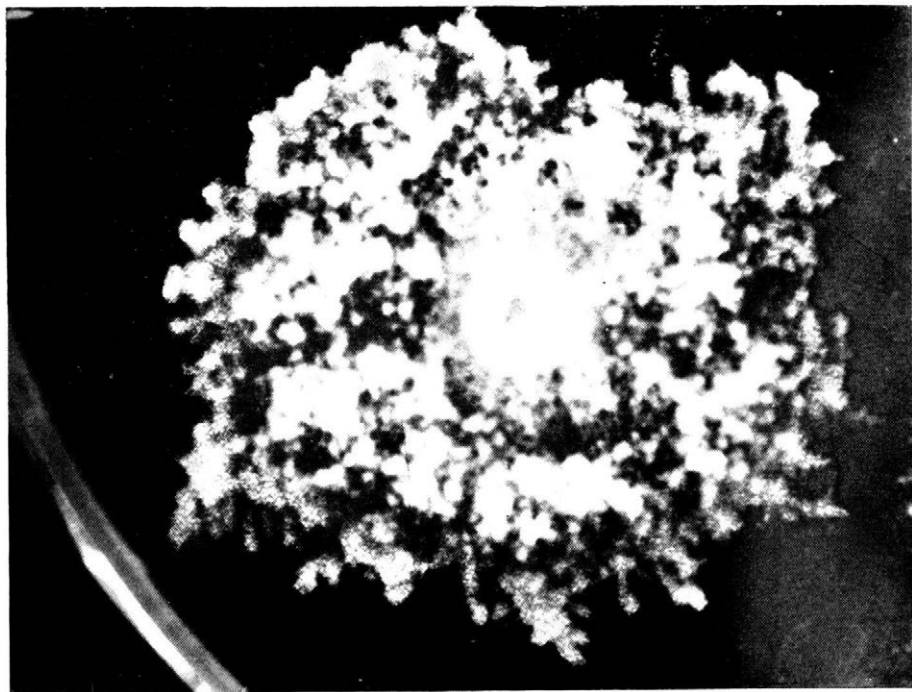
12. Růst na 10 jednotkách penicilínu na 7 ml půdy byl pozitivní u 14 kmenů *Bac. anthracis*. U antrakoidních kmenů byl pozitivní růst u všech 40 kmenů.

13. „Perlový test“

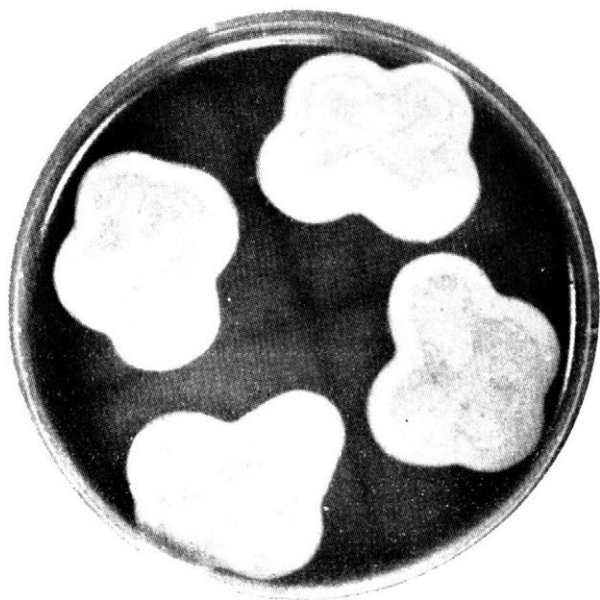
Při prohlížení na Petriho misce se perly vytvořené v řetězcích bacilů jeví ve fázovém kontrastu jako svítící kuličky (stejně jako spory v nativních preparátech bacilů), jenže proti těmto mají větší průměr a vydouvají značně tělo mikroba. Při posouzení perlového testu věnujeme nejprve pozornost kontrolním kultivacím (na MP agaru bez penicilínu). Zde všech 67 zkoušených kmenů rostlo typicky, tj. vytvářelo delší řetězce obvyklého tvaru a uspořádání (obrázek 5). Na půdách s přísadou s 0,05 a 0,5 m. j. penicilínu/ml vytvořilo všech 67 kmenů perlovité změny pozorovatelné zcela zřetelně. Při tom na agaru s 0,05 m. j./ml jeden kmen vytvářel perly drobné a u sedmi kmenů byly perly řídce rozložené. Na koncentraci 0,5 m. j./ml (obrázek 6) 11 kmenů vytvářelo perly řídce a



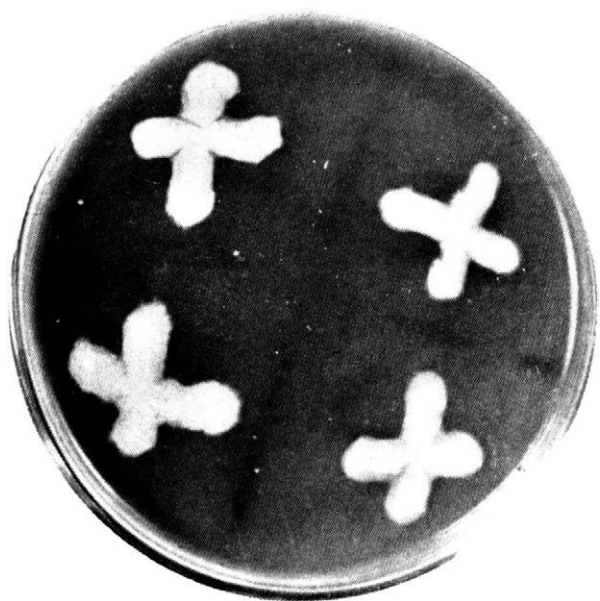
Obr. 1. Negativní výsledek zkoušky pohyblivosti kultivací na 0,75 o/o agarové plotně; růst v místě očkování. Ukázka dvou typů růstu: a) kmen A 11, b) kmen A 53.



Obr. 2. Pohyblivé antrakoidní kmeny se rychle rozrůstají z místa očkování na 0,75 o/o agarové plotně. (Stejně zvětšení, jako u obr. 1 a, b.)



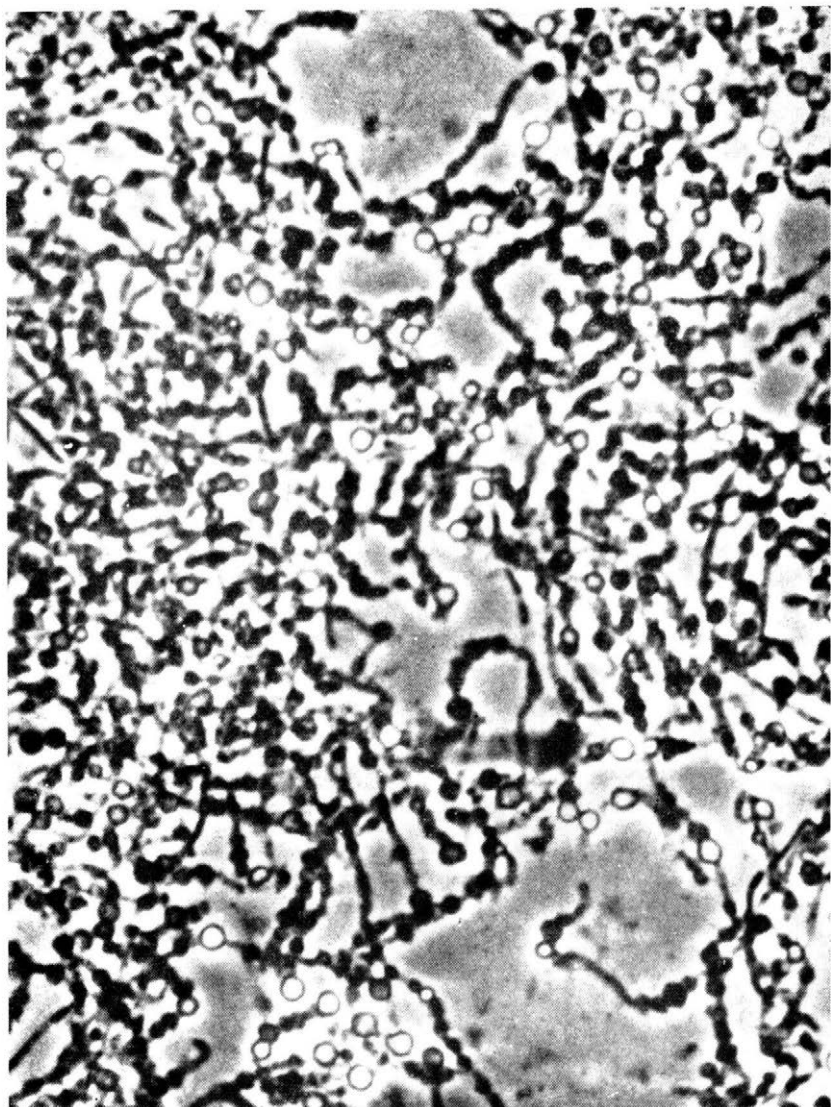
Obr. 3. Charakteristická zóna precipitátu na žloutkovém agaru v okolí růstu u čtyř naočkovaných antrakoidních kmenů.



Obr. 4. Růst kmenů *B. anthracis* na žloutkovém agaru bez tvorby široké precipitační zóny. (Srovnej s obr. 3).



Obr. 5. Růst *B. anthracis* (kmen A 33) na agaru bez penicilínu. Fázový kontrast, objektiv 20X, okulár Fo 12X, zvětšení negativu = 1:120, negativ:positiv = 1:7.



Obr. 6. Vytvoření perel při růstu *B. anthracis* na půdě s obsahem 0,5 jednotek penicilinu ml. (Zvětšení stejné, jako na obr. 5.)

12 kmenů mělo perly řídce rozložené a slaběji vyvinuté. Test však vyzněl zcela přesvědčivě a morfologické změny proti růstu na kontrolním agaru byly velmi značné (srovnej obrázky 5 a 6).

Srovnáme-li s těmito výsledky pozorování růst antrakoidních kmenů vidíme velmi nápadný rozdíl. Perlový test vyzněl u všech 40 zkoušených kmenů negativně. Při tom 37 kmenů rostlo na obou koncentracích penicilínu zcela beze změn a typicky jako na kontrolním agaru bez penicilínu. U jednoho kmene zdůřovaly některé tyčinky v koncentraci 0,5 m. j. penicilínu/ml, takže měly mírně kyjovitý tvar, u dvou kmenů byly tyto změny na obou koncentracích penicilínu. V žádném případě však nelze zaměnit toto zduření s vytvořenými kuličkovými perlami antrakových kmenů.

Diskuse

K jednotlivým užitým metodám (1. až 13., viz str. 677) poznamenáváme:

Ad. 1, 2 a 4:

V souhlase s Jensenem a Kleemeyerem (1953) a Ivanovicem a Földesem (1958) konstatujeme, že pouhé posouzení morfologie tyčinek a tvaru kolonií nedostačuje pro diferenciaci *B. anthracis* od antrakoidních kmenů.

Ad. 3:

Jensen a Kleemeyer (1953) uvádějí typický růst v bujónu u 48 kmenů, zatímco dva kmeny vytvářeny zákal, a to shodně jako kmeny antrakoidní. V našem případě byl růst v bujónu u antrakových kmenů typický a nedovoloval záměnu s antrakoidními.

Ad. 5:

Padesát antrakových kmenů zkoušených Jensenem a Kleemeyerem (1953) netvořilo hemolýzu na krevním agaru po 24 hodinách a stejně tak se v jejich pokusech chovalo sedm antrakoidních kmenů. Ostatních 36 antrakoidních hemolýzovalo. V našich zkouškách rostly též všechny antrakové kmeny bez hemolýz. Antrakoidní kmeny pro naše pokusy byly izolovány již jako hemolyzující z kultivací na krevních agarech.

Ad. 6:

Negativní zkoušky pohyblivosti antrakových a pozitivní výsledky kultivací antrakoidních kmenů jeví se podle našich pokusů jako vhodné pro diferenciální diagnostiku. Jensen a Kleemeyer (1953) pak ve své práci uvádějí vedle 50 nepohyblivých kmenů antraxu též 10 nepohyblivých antrakoidních kmenů (vedle 33 pohyblivých). Přes to však můžeme z toho vyvodit, že prokábaná pohyblivost může přispívat ke snížení nejistoty, případně podezření při diferenciální diagnostice.

Ad. 7:

Diferenciálně diagnosticky je významný typický růst *Bac. anthracis* v želatině a zkapaňování želatiny antrakoidními kmeny. Tato zkouška je podle mínění Jensena a Kleemeyera (1953) mimo perlový test jedinou další spolehlivou zkouškou, u které nedochází k překrývání výsledků.

Ad. 8:

V našich pokusech se pro diferenciální diagnostiku velmi osvědčila žloutková plotna, jak ji doporučil Seidel, shodně s konstatováním Ivanovicem a Földesem (1958), že enzymy štěpící lecithin vyznačují kmeny *B. cereus*.

Ad. 9:

Ke snížení podezření z antraxu u antrakoidních kmenů může velmi dobře přispět test s odbarvováním prontosilu, který je doporučován Seidlem (1958) a Nižňanským (1958). Do pěti dnů v našich pokusech odbarvila velká většina (37 ze 40) antrakoidních kmenů prontosil, zatímco v této době odbarvil prontosil teprve jeden antrakový kmen.

Ad. 10:

Jak vyplývá z tabulky o zkoušce patogenity není tato jednoznačnou pro diferenciální diagnostiku. U jednoho z antrakových kmenů zůstala na živu po dvou dnech jedna myš a u dvou kmenů obě myši. Naproti tomu sedm antrakoidních kmenů usmrtilo obě myši a 11 antrakoidních kmenů usmrtilo jednu myš ze dvou. Jensen a Kleemeyer (1953) uvádějí, že z 50 kmenů *B. anthracis* bylo 34 patogenních pro myš a morče 11 pro myš a pět nepatogenních pro myš a morče.

U antrakoidních kmenů uvedení autoři nezkoušeli patogenitu, protože podle zkušenosti usuzují, že výsledky bývají stejně různé.

Ad. 11.

Ascoliho reakce nedávala vždy jednoznačné výsledky. V pokusech Jensen a Kleemeyera bylo z 50 kmenů 26 kmenů pozitivních, 13 neurčitých a 11 negativních. Podle sdělení Křivinky (1959) a Prokůpka (1959) bývají nestejné výsledky i při precipitačních reakcích z kůží při použití sér různého původu. Orientační zkouška na notorických antrakových kmenech provedená třemi různými séry nám tyto údaje potvrdila (viz tabulku II).

Ad. 12:

Citlivost *B. anthracis* k penicilínu je význačnou rozlišovací vlastností, jak konstatuje Ivanovics a Földes (1958). Gustafson a Svehag (1956) uvádějí, že ačkoliv *B. anthracis* produkuje penicilínázu, nesouvisí to s citlivostí tohoto mikroba vůči penicilínu. Seidel (1958), i když doporučuje půdu s 10 jednotkami penicilínu na 1 ml k diferenciální diagnostice, poznamenává, že je možné počítat s výskytem penicilínorezistentních kmenů, což je sice zatím jen vzácným zjevem, avšak v budoucnu může být častější.

Ad. 13:

Perlový test doporučují pro diferenciální diagnostiku Jensen a Kleemeyer (1953) vedle růstu v želatině jako zkoušku, kde se u obou skupin nepřekrývají stejné výsledky. Weidenmüller (1952) zkoušel různé metody pro diferenciální diagnostiku a dospěl k názoru, že nejlepší je perlový test. Gustafson a Svehag (1955) uvádějí, že ze 44 kmenů, které vyšetřovali, 43 kmenů bylo citlivých v rozmezí 0,01 až 0,1 jednotek penicilínu/ml a jeden kmen v rozmezí 4 až 12 jednotek penicilínu/ml. Právě tento jediný kmen (když byl zkoušen v perlovém testu) nevytvořil typické morfologické změny v žádné koncentraci penicilínu, ačkoliv u ostatních kmenů byla typická reakce při obou koncentracích.

Proto jsme si pokusně prověřili perlový test i u kmenů s vyšší rezistencí vůči penicilínu. Pět kmenů bylo rezistentních vůči 0,5, 47 kmenů bylo rezistentních v rozsahu 1 až 9 m. j. penicilínu/ml a 15 kmenů v rozsahu 10 až 30 m. j. penicilínu/ml půdy. U všech antrakových kmenů bez rozdílu rezistence vyzněl v našich pokusech perlový test přesvědčivě pozitivně. Vzhledem k nebezpečí původní metodiky perlového testu, o němž hovoří též Seidel (1958), jsme se zdarem použili kultivace na Petriho miskách, kde není nutné manipulovat s otevřenou

kulturou a považujeme tento postup za způsobilý k rutinní diagnostice pomocí perlového testu, jehož prověření v našich laboratořích doporučuje Nižnánský (1958).

Souhrn

1. V práci byl prověřen perlový test, doporučovaný pro diferenciální diagnostiku, na 67 kmenech *Bac. anthracis* a 40 kmenech antrakoidních bacilů. S úspěchem byla použita vlastní, bezpečnější modifikace metodiky, která spočívá v tom, že se kultivuje na agarové plotny síly 2 až 3 mm přímo v Petriho miskách, v nichž se též provádí mikroskopické hodnocení objektivem 10× až 20×.

2. Test byl pozitivní u všech kmenů *B. anthracis* přesto, že z těchto 67 kmenů bylo pět kmenů rezistentních vůči 0,5 m. j. penicilínu/ml, 47 s rezistencí 1 až 9 m. j./ml a 15 kmenů s rezistencí 10 až 30 m. j./ml. Negativní výsledek testu byl u všech 40 kmenů aerobních sporotvorných bacilů antrakoidních.

3. Z dalších 12 metod užitých v naší práci se osvědčilo pro diferenciální diagnostiku zvláště pět metod, u nichž nedošlo k překrývání výsledků:

1. růst v bujónu,
2. hemolýza,
3. pohyblivost,
4. růst v želatině (vpich),
5. průkaz lecitinázy ve žloutkovém agaru.

Další v řadě spolehlivosti jsou:

6. odbarvování prontosilu (kde jen tři kmeny ze 40 antrakoidních vykazovaly opožděné odbarvení),
7. Ascoliho reakce (kde záleží na původu a kvalitě séra),
8. pokus na zvířeti,
9. růst na půdě s 10 m. j. penicilínu,
10. tvar kolonií na agaru.

Mikroskopický preparát z agarové plotny nebo z bujónu nemůže rozlišit obě skupiny bacilů.

*

Za technickou spolupráci děkujeme M. Stehlíkové a Z. Novotné.

Literatura

Breed R. S., Murray E. G. D., Smith N. R.: Bergey's manual of determinative bacteriology. 7 vyd. Baltimore 1957. — Gustafson B. A., Svehaug S. E.: The resistance condition in *Bac. anthracis* and some anthrax-like organisms Nord. vet. med. 8, 902-908 1956. — Harnach R., Mesároš E., Pleva V.: Výzkum přirozené a uměle zvyšované rezistence terénních kmenů *Bac. anthracis* vůči penicilínu, streptomycinu a aureomycinu. Veterinársky časopis IX, 1, 56-64, 1960. — Ivánovics G., Földes J.: Problems concerning the phylogenesis of *B. anthracis*. Acta microbiol. hung. 5, 89-109, 1958. — Jensen J., Kleemeyer H.: Die bakterielle differentialdiagnose des Anthrax mittels eines neuen spezifischen Testes („Perlschnurtest“). — Zblt. Bakt. I orig. 159, 491-500, 1953. — Křivinka J.: Ústní sdělení (1959). — Nižnánský F.: *Bacillus anthracis* - Stať na str. 444v „Mikrobiologické

vyšetřovací metody“, red. Raška K., Praha 1958. — Prokůpek K.: Ústní sdělení (1959). — Seidel G.: Die aeroben Sporenbildner in der täglichen Praxis der bakteriologischen Untersuchung der von Tieren stammenden Lebensmittel. Der Lebensmitteltierarzt 5, č. 15/16, 17/18, 19/20, 1954. Arch. f. Lebensmittelhygiene 9, 41-42, 102-103, 1958. — Weidenmüller H.: Mh. Tierheilk, 6, 1956, citováno podle Jensen-Kleemeyer, 1953.

Применение жемчужного теста в диагностике сибирской язвы (*Bacillus anthracis*)

В работе проверялся жемчужный тест, рекомендуемый для дифференциальной диагностики, на 67 штаммах *Bac. anthracis* и 40 штаммах антракоидных бацилл. Успешно применялась собственная, более безопасная модификация методики, основанная на том, что культура разводится на агаровой пластинке толщиной в 2—3 мм непосредственно в чашках Петри, в которых проводится также микроскопическая оценка при помощи объектива с увеличением в 10—20 раз.

Тест был положительным у всех штаммов *B. anthracis*, несмотря на то, что из этих 67 штаммов 5 штаммов были устойчивы к действию 0,5 МЕ пенициллина/мл, 47 — с устойчивостью 1—9 МЕ/мл и 15 штаммов — 10—30 МЕ/мл. Отрицательный результат теста установлен у всех 40 штаммов аэробных спорообразующих антракоидных бацилл.

Из дальнейших 12 методов, использованных в работе вышеуказанных авторов, наиболее пригодными для дифференциальной диагностики оказалось 5 методов, при которых результаты остались непокрытыми. Эти методы следующие:

1. рост в бульоне,
2. гемолиз
3. подвижность
4. рост в желатине (уколочная культура)
5. доказательство лецитиназы в желточном агаре.

Anwendung des Perlschnurtestes in der Diagnostik des *Bacillus anthracis*

Die Arbeit behandelt die Überprüfung des Perlschnurtestes, der zur Differentialdiagnostik vorgeschlagen worden war, an 67 Stämmen des *Bac. anthracis* und an 40 Stämmen anthrakoider Bazillen. Mit Erfolg wurde eine eigene, zuverlässigere Modifikation der Methodik angewandt, die darauf beruht, daß man auf Agarplatten von 2—3 mm Dicke direkt in den Petrischalen kultiviert, in denen auch die mikroskopische Beurteilung mittels Objektiv 10X—20X erfolgt.

Der Test war positiv bei allen Stämmen des *Bac. anthracis*, trotzdem unter den 67 Stämmen 5 Stämme waren, die gegen 0,5 IE/ml von Penizillin resistent waren, 47 resistent gegen 1—9 IE/ml und 15 Stämme resistent gegen 10—30 IE/ml. Negativ war das Ergebnis bei allen 40 aeroben, sporenbildenden anthrakoiden Stämmen.

Von weiteren 12 in unserer Arbeit angewandten Methoden haben sich bei der Differentialdiagnose insbesondere 5 bewährt, bei denen keine Überdeckung der Ergebnisse aufgetreten war:

1. Wachstum auf Bouillon,
2. Haemolyse,
3. Beweglichkeit,
4. Wachstum auf Gelatine (Stichkultur),
5. Nachweis der Lecithinase im Eigelbagar.

Studie o etiologii infekční orchitidy býků v ČSSR

Изучение этиологии инфекционного орхита быков в Чехословакии

Studium der Ätiologie der ansteckenden Hodenentzündung der Bullen in der Tschechoslowakischen Republik

Jaromír MENŠÍK, Jiří BOHÁČ, Rudolf ŠETKA
VUV Brno, Bioveta Terežín, KNV České Budějovice
Technická spolupráce M. Davidová

Došlo dne 12. V. 1960

Úvod

Na infekční povahu chronického granulačního zánětu varlat býků, který se v posledních dvou letech objevoval sporadicky v některých inseminačních stanicích v českých zemích a v některých oblastech měl dokonce charakter enzootie, upozornil u nás poprvé Šetka (17), který provedl několik pokusů o průkaz infekciózní ejakulátů nemocných býků. Ale již v roce 1958 poukázal na častost nálezů orchitid granulačního až tuberkuloidního charakteru Blažek (19). O podobných případech referoval Věžník (19) a popsal jejich klinický obraz. Přehled současných poznatků, týkajících se této problematiky ze světové literatury, podal Sakala (15) a upozornil na možnost výskytu infekčních zánětů varlat býků a infekční vaginitidy a cervicitidy i v našich zemích. Podrobně popsal klinický obraz onemocnění, které způsobuje dočasnou nebo trvalou sterilitu a jehož virová etiologie byla prokázána již řadou cizích autorů.

Vzhledem k značnému rozšíření onemocnění v SPS v roce 1958 a se zřetelem na hospodářské ztráty, které způsobuje snížením procenta zabřezávání krav a jalovic a vyřazováním býků s trvalou poruchou spermiogeneze, uložila nám veterinární správa MZLH, abychom se ve spolupráci s jinými pracovišti pokusili o průkaz virové etiologie této choroby, když dosavadní mikrobiologická vyšetření nedala uspokojivé výsledky.

První případy tohoto onemocnění, které bylo poprvé pozorováno v Kenyi, popsal v letech 1927/28 Purchase (12) a nazval je „nakažlivá cervicovaginitis a epididymitis“. Daubney a spol. (3), kteří přepokládali, že původcem je virus, použili v roce 1938 název „infekční nebo enzootická neplodnost skotu“. Van Rensburg (13) a Hennig (5) ji zjistili v Jihoafrické unii v roce 1949. O virové vaginitidě referoval v Anglii poprvé Blake more 1952 (1).

Z infekčního materiálu, získaného z různých stád s klinickou diagnózou „epi-vag“ izolovali McIntosh, Haig a Alexander (6) na chorioalantoidních blánách osmidenních kuřecích embryí a v mozkové tkáni bílých myšek, virus, který

způsobil edematózní zduření chorioalantoidní blány a hynutí embryí za 3 až 4 dny po infekci na chorioalantoidní blány a do žloutkového vaku. Virus pěstovaný na vejcích vyvolával mírné vaginitidy u zdravých krav a jalovic. Autor považuje klinickou diagnózu „epivag“ za nepřesnou, protože změny mají často extrémně různý charakter a nelze vyloučit možnost působení více etiologických činitelů. Za 48 hodin po experimentální infekci virem se objevila u jalovic *vaginitis* a výtok cervicovaginálního hlenu s hnisem byl podobný jako po přirozené infekci v zamořených stádech. Pokusy potvrdily, že příčinou neplodnosti je izolovaný virus.

Pozdější práce *Haig a McIntosh* (4) předpokládá, že virus, který byl izolován, je spíše původcem kontagiózní vaginocervicitidy než „epivagu“. Jeho velikost byla stanovena na 100 m μ . Zpětná izolace viru se zdařila autorům z krve, získané během mírné horečnaté fáze choroby.

Millar (11) popsal virovou neplodnost skotu jako samostatné virové onemocnění. Dokázal přenos onemocnění instilací filtrátu vaginálního hlenu nemocných jalovic a semene nemocných býků do vaginy zdravých jalovic, u nichž se objevila vaginitida. Také zdraví býci, připuštění na infikované jalovice, onemocněli purulentními záněty genitálií s lehčím průběhem. Nemoc bylo možno experimentálně přenést i na kozu, u níž byly zjištěny nápadné změny na děloze za 16 dní po infekci. Pozitivní byla též izolace viru na slepičích embryích, a to jak na chorioalantoidních blanách, tak ve žloutkových vacích. Na chorioalantoidních blanách se ukázalo nápadné ztlustění a po infekci do žloutkových vaků došlo ke koagulaci žloutku. Po 12 pasážích na chorioalantoidních blanách a osmi pasážích ve žloutkových vacích vyvolal virus instilovaný do vaginy edematózní endometritidy a vestibulární vaginitidy. Další přímý přenos z nemocných jalovic na zdravé byl úspěšný. Sérologické vyšetření VK se séry nemocných zvířat bylo však negativní.

Zdařilé pokusy o izolaci viru z případů katarálních vaginitid skotu v Kalifornii popsali *Kendrick a spol.* (7, 8) v roce 1956 a 1958. Klinicky zjišťovali hyperemii vaginy a krčku, který byl edematózní, ve vagině se hromadil žlutý nezapáchající mukoidní exudát. Dobu trvání onemocnění stanovili asi na tři měsíce. U býků pozorovali zánět semenných váčků a hnis v semeni bez makroskopických změn na varlatech a nadvarlatech. Infekci embryí na chorioalantoidní blány a do žloutkových vaků prováděli trypsinovaným a filtrovaným vaginálním exudátem od nemocných zvířat z terénu, metodou zkrácených titrací. Hlavním projevem pomnožení viru v zárodcích bylo jejich odumření za 3 až 5 dní po injekci. Mortalita embryí se stabilizovala po čtyřech pasážích a při infekci do žloutkových vaků dosáhla 100 %. Virus bylo možno rovněž přenést ze slepičích embryí na bílé myšky *i. c.* aplikací. Autorům se opakovaná izolace z dalších terénních případů již nezdařila. Zachycený virus se ukázal ještě po 8 a 11 pasážích patogenní pro zdravé jalovice, u nichž vyvolal typické onemocnění a zpětná izolace viru na chorioalantoidních blanách a ve žloutkových vacích slepičích embryí byla pozitivní. Autoři konstatují, že onemocnění jimi popisované se podobá nákaze vyskytující se v Africe. Oba viry se však od sebe liší rozdílnou schopností adaptace na slepičí embrya a musí být sérologicky rozlišeny.

Zotov (18) popsal klinické příznaky onemocnění, nazvaného Infekciony cervikovaginit, takto: U krav je inkubační doba několik dní, u býků 4 až 10 týdnů. U býků se objevuje mírné zesílení semenného provazce, zánět nadvarlete, který se rozšíří i na varle. Změny jsou zpočátku jedno, později oboustranné, ve spermatu se objevují leukocyty, dojde k ucpání cest semenných, k atrofii tkáně varlete a k impotenci. U krav je klinický obraz značně rozdílný. První pří-

znaky se dají zjistit v přední části pochvy blízko krčku děložního jako zánětlivá ložiska, objevující se za 2 až 4 dny po experimentální infekci. Za 5 až 7 dní se zjišťuje žlutý výtok z pochvy. Onemocnění má chronický průběh s tendencí k rozšíření do dělohy, kde vzniká katarální *endometritis* a *salpingitis*. Trvalá neplodnost postihuje asi 25 % onemocnělých zvířat.

Onemocnění s podobnými příznaky popisuje i Rumjancev (14) v kapitole o virových pohlavních nákazách, a Serov a Pjankov (16) v systematickém literárním přehledu.

McClore (2) se zmiňuje o výskytu neplodnosti skotu s obrazem purulentních vaginitid a cervicitid na Novém Zélandě v roce 1956. O rok později izoloval virus z filtrátu vaginálního hleny na chorioalantoidních blanách. Změny na chorioalantoidních blanách způsobené virem popsal jako silný edem blány s různým počtem bílých okrsků a s výraznou choriovou proliferací. Hynutí embryí bylo však nedostatečné. Experimentální přenos na zdravé jalovice se dařil jak vaginálním hlenem samým, tak chorioalantoidními blánami infikovaných embryí.

V poslední době pokračovali ve studiích infekční sterility skotu virového původu Kercher a spol. (9), kteří na základě předchozích prací Kendricka a spol. (7, 8) a Gillespie a spol. potvrdili experimentálně na jalovicích, že virus infekční rhinotracheitidy skotu (IBR) a virus infekční pustulovaginitidy (IPV) jsou jedno a totéž agens. Své zjištění, že virus IBR může vyvolat dva rozličné syndromy u skotu, považují z hlediska epizootologie za velmi významné. Onemocnění IPV, které se vyskytuje ve státě Iowa, je považováno za podobné, nikoliv však shodné s coitálním vesikulárním exantem popsaným v evropské literatuře.

Vlastní práce

V naší práci jsme se zabývali pokusy o izolaci viru z nemocných býků, u nichž probíhala chronická orchitida, která měla charakter enzootie a způsobila ve dvou inseminačních stanicích v jižních Čechách dočasnou nebo trvalou sterilitu s výraznými poruchami spermiogeneze. Bylo naším úkolem potvrdit infekční povahu onemocnění a pokusit se o experimentální infekci zdravých býků a jalovic izolovaným infekčním agens. V tomto sdělení referujeme o výsledcích našich pokusů, které navazují na předchozí pokusy Šetkovy (17).

Materiál a metodika

Izolační pokusy

Pokusy o izolaci viru byly prováděny na slepičích embryích běžnou virologickou technikou, metodou infekce na chorioalantoidní blánu. Z počátku jsme očkovali embrya 12- až 13denní, později po zjištění, že pomnožené agens zabíjí zárodky po 2 až 5 dnech inkubace, infikovali jsme vejce 9- až 11denní. Jako výchozí materiál k infekci byly používány:

1. Tkáň z varlat a nadvarlat nemocných býků, poražených nebo jedno- i oboustranně kastrovaných.

2. Ejakulát býků nemocných nebo z nemoci podezřelých, případně býků experimentálně infikovaných.

3. Vaginální hlen nebo hlenohnisavý výtok jalovic experimentálně infikovaných, získaný výtěrem pochvy sterilním tamponem, uloženým v bujónu s přísadou antibiotik.

4. Děložní exsudát odebraný po porážení pokusných jalovic.

5. Tekutina z ovariálních cyst, odebraná po porážce pokusných zvířat.

Materiál byl po odběru uložen při teplotě -20°C až do dne zpracování. Z tkáně varlat byla připravena rozetřením 10% suspenze s fyziologickým roztokem, ostatní materiál byl ředěn fyziologickým roztokem v poměru 1 : 10. Bujónová suspenze hlenu byla používána neředěná. Všechny připravené suspenze jsme před infekcí preparovali antibiotiky v množství 1000 j. penicilínu a 1000 gama streptomycinu na 1 ml tekutiny, přezkoušeli na bakteriální sterilitu a infikovali v dávce 0,2 ml.

Infikovaná vejce byla pravidelně dvakrát denně prosvěcována, posouzena kvalita a životnost zárodků, odumřelé zárodky ukládány v lednici při $+4^{\circ}\text{C}$ a po vychladnutí otevírány. Stejně byla zpracována i živá embrya po šesti dnech inkubace. Chorioalantoidní blány byly po proprání fyziologickým roztokem posuzovány jednotlivě.

Pomnožení viru na chorioalantoidních blanách se projevilo makroskopicky patrnými změnami, tvorbou uzlíků a odematózním zduřením, v dalších pasážích odumřením zárodků za 2 až 5 dní po infekci. Sterilní chorioalantoidní blány jsme ukládali při teplotě -20°C a používali k dalším pasážím, nebo k infekci pokusných zvířat jako 10% suspenze neředěné, nebo v desetinásobných ředěních. V některých pasážích byla titrací na vejcích stanovena hodnota LD 50 %.

Kultivace agens v TK

Souvislé porosty z dospělých hovězích ledvin připravené podle Madina a spol. (10) v Rouxových lahvích 1200 ml, 6 až 8 dní staré, byly infikovány 10% suspenzí chorioalantoidních blan nebo 10% suspenzí žloutkových vaků slepičích embryí II. pasáže. Růstové medium bylo před infekcí odstraněno a na kulturu stejnoměrně navrstvena infekční suspenze. Po 30minutové inkubaci při 37°C byla tekutina slita a přidáno záchovné medium. Jako růstového media jsme používali Hanksův roztok s 0,25 % LAHU a 10 % hovězího séra. Sklizeň byla prováděna u izolace a I. pasáže po 24 hodinách, u dalších pasází po 48 hodinách až po čtyřech dnech.

Biologické pokusy

Pozitivní výsledky izolačních pokusů na slepičích embryích jsme ověřovali experimentální infekcí jalovic a býků. Zvířata k pokusům byla vybírána z výkrmů, kam přicházela ještě před pohlavní dospělostí a neměla možnost přijít do styku s infekcí. Infekce býků byla prováděna vstříknutím 2 až 5 ml 10% suspenze z chorioalantoidních blan intratestikulárně, nebo veřněním infekčního materiálu do předkožkového vaku. Pro kontrolu byl infikován jeden býk 10 ml 10% suspenzí z chorioalantoidních blan zdravých, neinfikovaných slepičích zárodků.

Jalovice jsme infikovali poíráním sliznice vaginální tamponem namočeným v infekční tekutině, nebo infuzí této tekutiny do vaginy až ke krčku děložnímu. Souběžně byly prováděny infekce jalovic ejakulátem nemocných býků, který byl do vaginy vpraven běžnou inseminační technikou, nebo byly jalovice připouštěny infikovaným býkem. Výsledek experimentální infekce jsme hodnotili na základě klinického a patologicko-anatomického vyšetření v průběhu onemocnění, po porážce nebo kastraci.

I. Výsledky virologického vyšetření býků z terénu

Vzo- rek č.	Býk č.	Vyšetřovaný materiál	Virologické vyšetření			
			vaječ- ná pasáž	nejvyšší ře- dění výcho- zího mate- riálu	% uhynulých zárodků	zjištěné změny
1	III.	ejakulát	3	10^{-4}	90	fokusy, blány ro- solovité, drobné krváceniny
2	PR 26	ejakulát (od- běr v únoru)	3	10^{-4}	90	drobné krváceniny
3	Mj 8	ejakulát (od- běr v únoru)	3	10^{-4}	90	dtto
4	I.	varlata	3	10^{-4}	90	dtto
5	II.	varlata	3	10^{-4}	90	dtto
6	III.	varlata	3	10^{-4}	90	dtto
7	Bo 270	varle	3	10^{-1}	100	blány ztlustělé
8		ejakulát	3	10^{-1}	100	dtto
9	10	ejakulát	2	10^{-1}	100	dtto
10	Pas 125	ejakulát	3	10^{-1}	100	dtto drobné krváceniny
11	Š 64	ejakulát	2	10^{-1}	100	dtto
12 13 14	M 84	ejakulát (1) ejakulát (2) ejakulát (3)	viz tabulka II.			poz. poz. poz.
15	Mo 164	ejakulát	3	10^{-2}		neg.
16	118	dtto	3	10^{-2}		neg.
17	CS 584	dtto	3	10^{-2}		neg.
18	Mo 212	dtto	3	10^{-2}		neg.
19	PR 26	dtto odběr v červenci	3	10^{-2}		neg.
20	Mj 8	dtto odběr v červenci	3	10^{-2}		neg.
21	Ša 56	dtto	3	10^{-2}		neg.
22	Mo 300	ejakulát	3	10^{-2}		neg.
23	Rd 52	dtto	3	10^{-2}		neg.
24	Ša 88	dtto	3	10^{-2}		neg.
25	Rd 122	dtto	3	10^{-2}		neg.

V ý s l e d k y

Pěstování infekčního agens na slepičích embryích a v TK

Po řadě předběžných izolačních pokusů z materiálu, zasílaného k vyšetření z různých inseminačních stanic v Čechách a na Moravě a po zavedení vhodující metodiky, věnovali jsme se trvale studiu hromadného onemocnění býků v jedné inseminační stanici v jižních Čechách. Z tohoto zdroje jsme vyšetřili celkem 24 vzorků ejakulátu a jedno varle ze zvířat přirozeně infikovaných, u nichž byly zjištěny buď zjevné klinické příznaky onemocnění nebo porucha spermiogeneze.

Z celkového počtu 25 provedených izolačních pokusů bylo 11 případů negativních. V ostatních případech jsme zjišťovali zpravidla již v prvních dvou pasážích výrazné, makroskopicky zjevné změny na chorioalantoidních blanách po 2 až 5 dnech inkubace. Blány byly ztlustělé edematózní až rosolovité, někdy čiré, jindy difúzně zkalené, často s četnými tečkovitými krváceninami. V některých liniích se již v prvních pasážích objevovaly zřetelné fokusy jako drobná ložiska velikosti špendlíkové hlavičky, nad povrch prominující, s šeděbílavým centrem, která tvořila v blízkosti místa vpichu drobné nebo rozsáhlejší ostrůvky, někdy difúzně rozložené po celé ploše blány. V prvních dvou pasážích jsme zaznamenávali až 50%, v dalších pak až 100% uhynutí embryí, počínaje třetím dnem inkubace.

Výsledky primoizolačních pokusů se stručným popisem změn na CA blanách jsou uvedeny v tabulce I.

Tyto výsledky, ověřené celou řadou pozitivních nálezů na infikovaných embryích a potvrzené vyšetřením ejakulátů z několika po sobě následujících odběrů od téhož býka (tabulka II), nás opravňovaly k domněnce, že jsme na slepičích embryích zachytili agens, které se dá udržovat pasážemi na vejcích a způsobuje často změny na chorioalantoidních blanách i hynutí embryí po 2 až 5 dnech inkubace. Vzhledem k trvale negativním výsledkům bakteriologického vyšetření semene i orgánů nemocných býků, předpokládáme, že zmíněný agens je s velkou pravděpodobností virus. Tento názor potvrzují naše další pokusy o zpětnou izolaci viru z ejakulátů a z varlat býků, nebo z genitálního traktu jalovic, použitých k experimentální infekci buď virem pasážovaným na vejcích, nebo ejakulátem, vaginálním hlenem, případně tkání z varlat uměle infikovaných zvířat (viz tabulku III a IV).

Celkem bylo provedeno tímto způsobem 16 izolačních pokusů s pozitivním výsledkem. Změny na chorioalantoidních blanách i hynutí embryí byly shodné s výsledky primoizolačních pokusů. Také LD 50 % dosáhla již ve čtvrté pasáži přibližně stejné hodnoty ($10^{-4,76}$).

Pěstované agens vyvolávalo hynutí embryí až do osmé pasáže. V dalších pasážích se mortalita embryí objevovala jen sporadicky, nebo k odumření zárodků již nedocházelo.

Předběžné výsledky pokusů o kultivaci agens, pasážovaného na slepičích embryích v tkáňové kultuře, ukazují, že již po 24hodinové inkubaci se objevuje slabě naznačený cytopatogenní efekt. Po dalších 24 hodinách je CPE již zřetelnější, buňky nabývají okrouhlého granulovitého tvaru a od skla se odlupují. Zpětná izolace viru z TK na slepičí embrya byla pozitivní po infekci do žloutkových vaků a na chorioalantoidní blánu. Po infekci do žloutkových vaků hynula většina embryí ve všech třech postupných pasážích. Po infekci na chorioalantoidní blánu k hynutí embryí již nedocházelo a změny se objevovaly nepravidelně a byly jen málo výrazné.

II. Výsledky virologického vyšetření ejakulátu býka M 84

Vzo- rek čís.	Odběr ejakulátu dne	Výsledek vyšetření			
		vaječná pasáž	nejvyšší řed. výchozího materiálu	% uhynulých zárodků	zjištěné změny
1	4. 3. 1959	1	10 ⁻¹		blány rosolovité, rozsev fokusů
		2	10 ⁻¹		blány rosolovité
		3	10 ⁻²		rozsev fokusů
		4	10 ⁻²	100	blány rosolovité
2	16. 4. 1959	1	10 ⁻¹		blány ztlustělé
		2	10 ⁻¹	100	blány ztlustělé
		3	10 ⁻²	100	
		4	10 ⁻²	100	
3	7. 5. 1959	1	10 ⁻¹		rozsev fokusů
		2	10 ⁻¹	50	blány ztlustělé
		3	10 ⁻¹	100	četné drobné krváceniny
Směs 4 vaj. pasáže z 1 a 2 odběru		5	10 ⁻¹	50	ditto
		6	LD 50 ‰	10 ^{-4,5}	ditto
		7	10 ⁻³	80 ‰	ditto
		8	10 ⁻³	90 ‰	ditto
		9	10 ⁻³	80 ‰	ditto
		10	10 ⁻³	80 ‰	ditto

Průkaz patogenního účinku viru biologickými pokusy

Biologickými pokusy jsme sledovali dvojí cíl.

1. Pasážováním předpokládaného infekčního agens na zvířatech dokázat infekční povahu onemocnění a udržet infekční agens virulentní v přirozeném hostiteli.

2. Infekcí zvířat materiálem z chorioalantoidních blan si ověřit patogenitu agens uměle pěstovaného na slepičích embryích pro zvířata a potvrdit virovou etiologii onemocnění.

Přehled výsledků nejdůležitějších biologických pokusů je uveden ve schématických nákresech č. I a II.

III. Výsledky virologického vyšetření vaginálního hleny jalovice č. Ib experimentálně infikované vaginálním hlenem jalovice Ia (linie M 84)

Vaječná pasáž	Nejvyšší ředění vých. materiálu	% uhynulých zárodků	Zjištěné změny	Použito k infekci	Výsledek infekce
1	10^{-1}	80	blány ztlustělé, zákal	jalovice 3 jalovice 5	poz. poz.
2	10^{-2}	50	blány ztlustělé, fokusy, místy zákal	žloutko- vých vaků	řed. 10^{-1} 100 % uhynutí zárodků
3	10^{-1}	100	drobné krváceniny blány dif. zkaleny		
4	10^{-1}	100	dtto		
5	LD 50 %	10^{-4} , ⁷⁶			
6	10^{-3}	60	dtto		
7	10^{-3}	60	drobné krváceniny, mírné ztlustění blan		
8	10^{-3}	100	drobné krváceniny, blány dif. zkaleny		
9	10^{-3}	80	dtto mírné ztlustění blan		
10	10^{-4}	60	drobné krváceniny		

Pokusy byly založeny z dvojího infekčního materiálu, který pocházel z téhož nákazového ohniska. V jedné řadě pokusů jsme použili jako výchozího materiálu ejakulátu býka M 84, ve druhé řadě ejakulátu býka P 125.

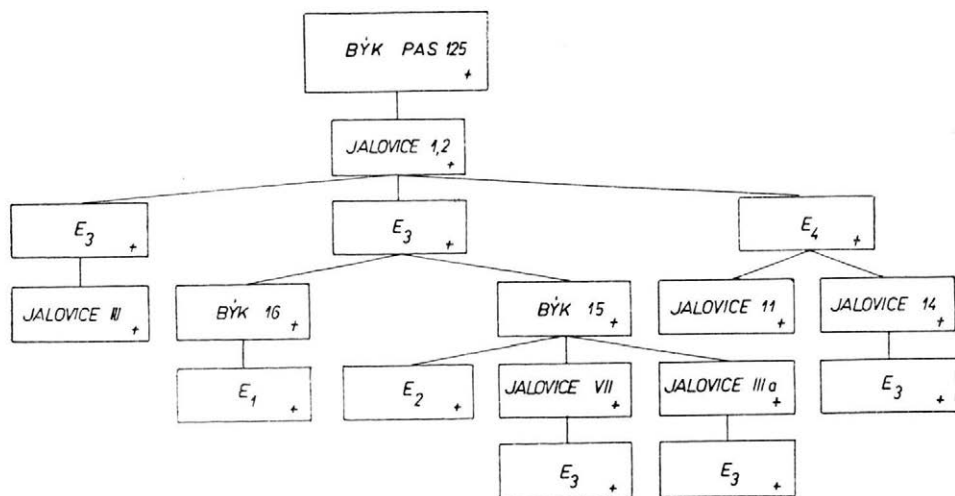
Pokusná linie M 84 (viz schéma č. I)

Z původního infekčního materiálu, ejakulátu býka M 84, jsme založili dvě řady pokusných infekcí. V první řadě jsme prováděli střídavé pasáže viru na vejcích a zvířatech, a to tak, že embrya byla očkovaná materiálem z pokusně infikovaných zvířat a znovu zachycené agens bylo použito opět k infekci zdravých jalovic a býků. Tímto způsobem bylo provedeno celkem sedm střídavých pasáží.

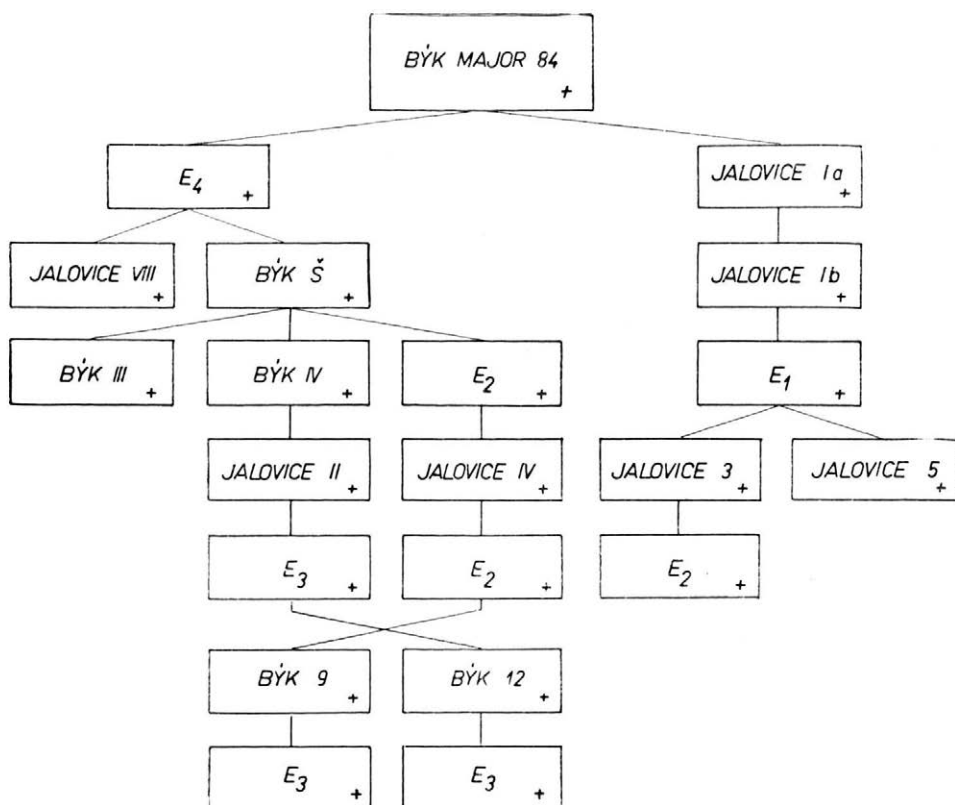
Druhá řada pokusů byla založena jako kontrolní a měla ověřit patogenitu infekčního ejakulátu pro jalovice v přímých pasážích. Přítomnost viru po II. přímé pasáži byla ověřena opět izolací agens na slepičích embryích (viz tabulku III).

Pokusná linie P 125

Výchozí infekční materiál, ejakulát býka P 125, v němž byla přítomnost viru prokázána ve třech vaječných pasážích, byl použit k infekci jalovic č. 1 a 2, které onemocněly za příznaků vaginitidy s hlenohnisavým výtokem. Po infekci



Graf 1. Přehled experimentálních infekcí býků, jalovic a slepičích embryí v pokusné linii Major 84



Graf 2. Přehled experimentálních infekcí býků, jalovic a slepičích embryí v pokusné linii Pas 125

IV. Výsledky virologického vyšetření vaginálních výtěrů jalovic č. 1 a 2 experimentálně infikovaných ejakulátem býka PAS 125

Vaječná pasáž	Jalovice čís.	Nejvyšší řed. výchozího materiálu	% uhynulých zárodků	Zjištěné změny	Použito k infekci	Výsledek infekce
1	1			zduřelé blány, zákal, fokusy		
	2			nekrotická ložiska, blány ztlustělé, dif. zkalené		
2	1	10 ⁻⁴	100	na 4 vejcích rozsev fokusů	jal. č. V.	poz.
	2	10 ⁻⁴	100	blány dif. zkalené, ztlustělé, četné drobné krváceniny		
3	1	LD 50 %	10 ^{-4,7}		býka č. 15	poz.
	2	LD 50 %	10 ^{-4,5}		býka č. 16	poz.
4	1,2	10 ⁻⁴	100		jalovice 11 jalovice 14	poz. poz.
5	1,2	10 ⁻³	90			
6	1,2	10 ⁻²	100			

slepičích embryí suspenzí vaginálního hlenu těchto jalovic bylo opět izolováno agens, které se udržovalo po řadu pasáží ve vejcích (viz tabulku IV).

Druhou, třetí a čtvrtou vaječnou pasáží jsme infikovali zdravé býky a jalovice. Všechny tři pasáže se ukázaly virulentní a infekce vyvolala jak u jalovic, tak i u býků typické klinické změny, jejichž specifičnost byla potvrzena zase zpětnou izolací viru z patologického materiálu.

Průběh a klinický obraz onemocnění u experimentálně infikovaných zvířat

U býků, infikovaných intratestikulárně do levého varlete 10% suspenzí chorioalantoidních blan, objevil se do 48 hodin nápadný jednostranný otok šourku. Palpací bylo zjištěno bolestivé zduření semenného provazce a varlete a edematózní ztlustění obalů varlete. Pohyblivost varlete vůči kůži šourku i obalům byla často značně snižena, šourek byl svěšený a uvolněný a činnost *m. cremaster* byla částečně nebo úplně porušena.

U některých býků jsme pozorovali 2 až 3 dny po infekci sniženou chuť k žrádлу.

Akutní příznaky zmizely asi za 2 až 4 týdny. Otok varlete se zmenšoval až zmizel úplně a varle postupně ztrácelo na objemu, při čemž na pohmat jevílo tužší vazivovitou konsistenci. V pozdějším období se vyvinula již zřetelná atrofie varlete, které bylo velikosti kachního vejce. Zduření semenného provazce jsme

V. Výsledky některých biologických pokusů na býcích

Označení býků	Materiál použitý k infekci	Výsledky infekce klin. nebo pat. anat. změny	Virologické vyšetření	
			materiál	výsledek
15	10% emulze E ₃ jalovice 1,2 (pas 125)	otok varlete, ztlustění semenného provazce, bo- lestivost, edem šourku	varle ejakulát	poz. poz.
16	dtto	dtto atrofie varlete, za 6 měs. exacerbace a přestup onemocnění na pravé varle	ejakulát	poz.
Š.	10% emulze E ₄ býk M 84	p. a.: atrofie varlete, granulační zánět	varle ejakulát	poz. poz.
III.	10% emulze z varlete býka Š.	klin.: orchitis, p. a.: krváceniny na sliz- nici penisu, atrofie var- lete, gran. tkáň	nevyšetř.	
IV.	dtto	klin.: orchitis p. a.: atrofie varlete, periorchitis	varle	poz.
9.	10% emulze E ₂₃ jalovice č. II. a IV. (M 84)	klin.: orchitis, otok varlete, p. a.: atrofie varlete, zmnožení vaziva	ejakulát	poz.
12.	dtto	dtto granulační tkáň	ejakulát	poz.

zjistili ještě za 6 měsíců po infekci (býk č. 16), kdy byl současně pozorován přestup onemocnění na pravé, neinfikované varle, který se projevil otokem varlete, zduřením semenného provazce, bolestivostí a oedemem šourku. Zpětná izolace agens z ejakulátu tohoto býka byla pozitivní.

V jednom případě jsme provedli jednostrannou kastraci býka za čtyři dny po infekci 5 ml infekční suspenze chorioalantoidních blan, ve stadiu akutních změn na varleti a semenném provazci. Při kastraci bylo zjištěno edematózní pro-
sáknutí *tuniky dartos* a přilehlé tkáně. Po protěti *tuniky vag. comunis* vyteklo značné množství jantarové tekutiny. Adspekci i palpaci zjišťované zvětšení šourku lze přičíst edematóznímu zduření *tuniky dartos* a značnému zmnožení tekutin v *cavum vaginale*. Místo vpichu po proříznutí varlete nevykazuje změn. Na *tunice vag. propria* jsou adheze menšího rozsahu.

Z tekutiny zachycené při kastraci bylo izolováno opět infekční agens ve třetí vaječné pasáži a také další infekce jalovic 10% supenzí vyoperovaného varlete dala pozitivní výsledek.

V pokročilejších případech jsme na varletech býků poražených nebo kastrováných za čtyři a více týdnů po infekci zjišťovali zřetelnou atrofii infikovaného varlete, ztlustění a zvazivovatění *tuniky vag. comunis* a ostatních obalů varlete až do síly 3 cm. Na řezu varletem pak pruhy vaziva prostupující z centra k okra-

VI. Výsledky některých biologických pokusů na jalovicích

Označení jalovic	Materiál použitý k infekci	Výsledky infekce klin. nebo pat. anat. změny	Virologické vyšetření	
			materiál	výsledek
1	ejakulát býka Pas 125	<i>vaginitis</i> , hlenohnisavý výtok	vag. výtěr	poz.
2	dtto	dtto	vag. výtěr	poz.
I b	vag. výtěr jalovice Ia (M 84)	<i>vaginitis</i>	vag. výtěr	poz.
14	10% emulze E ₄ jalovice 1,2 (Pas 125)	<i>vaginitis</i> , hlenohnisavý výtok	vag. výtěr	poz.
3	10% emulze E ₁ jalovice Ib (M 84)	<i>vaginitis</i> , hlenohnisavý výtok	vag. výtěr	poz.
II.	přirozeně infik. připuštěním býka č. IV.	Klin.: <i>vaginitis</i> , p. a.: hlenohnis. <i>vaginitis</i> , <i>endometritis</i> , ovariální cisty	cysta hlen z dělohy	poz. poz.
IV.	10% emulze E ₂ býk Š. (M 84)	klin.: <i>vaginitis</i> , p. a.: hlenohnis. <i>vaginitis</i> , <i>endometritis</i> , ovariální cisty	cysta hlen z dělohy	poz. neg.
VII.	10% emulze varlete býka č. 15 (Pas 125)	klin.: <i>vaginitis</i> , p. a.: <i>endometritis</i>	hlen z vag.	poz.
III.	dtto	dtto ovariální cisty	cysta hlen z krčku	poz. neg.
VIII.	10% emulze E ₄ býk M 84	klin.: <i>vaginitis</i> , hlenohnisavý výtok p. a.: <i>endometritis</i>	hlen z dělohy	neg.
5	10% emulze E ₁ jalovice Ib (M 84)	<i>vaginitis</i> , hlenohnisavý výtok	neprovedeno	

jům (býk č. 9 a Š). V některých případech jsme nacházeli pruhy šedožlutých ložisek, difúzně rozptýlené po řezné ploše, které připomínaly granulační tkáň a na řezu lehce skřípaly (býci č. III, IV, Š. a 12 v tabulce V). V jednom případě (býk č. III) jsme zjistili petechiální krváceniny na sliznici penisu.

Také v těchto případech byly pokusy o zpětnou izolaci infekčního agens a další přenos na zdravá zvířata pozitivní.

Kontrolní býci, infikovaní 10 ml 10% suspenzí chorioalantoidních blan zdravých, neinfikovaných embryí, zůstali bez klinických příznaků onemocnění a po tři týdny se u nich otok ani jiné chorobné změny neobjevily.

U jalovic infikovaných suspenzí chorioalantodních blan obsahujících infekční agens byly zjišťovány stejné změny jako po infekci ejakulátem, nebo suspenzí varlat nemocných býků. Po 1 až 2 dnech po infekci bylo možno pozorovat zarudnutí vaginální sliznice různého stupně, zduření folikulů zpravidla ve ventrální komiseře, později hlenovitý až hlenohnisavý výtok z pochvy. Tyto příznaky zmizely zpravidla za 7 až 10 dní po infekci a nebyly při běžném vyšetření kaudální části pochvy patrné. Jen u několika jalovic, které jsme měli možnost porazit za čtyři týdny po experimentální infekci, byla zjištěna vedle hlenohnisavé vaginitidy a cervicitidy ještě chronická *endometritis* s mukopurulentním hlenem a jedno- nebo oboustranná cystózní degenerace ovarií. Zpětná izolace viru na kuřecích embryích z vaginálního výtěru (jalovice č. 3), z děložního exsudátu (jalovice č. II. a IV.) a z ovariálních cyst (jalovice č. II., IV., viz tabulku VI) opět potvrdily specifickou povahu infekce.

Přehled některých biologických pokusů na býcích a jalovicích je uveden v tabulce V a VI.

Průkaz patogenity infekčního agens pěstovaného v TK byl proveden intra-testikulární infekcí zdravého býka. Za čtyři dny po infekci se objevila akutní *orchitis* a *epididymitis*, bolestivost, neklid a zvýšená teplota kůže šourku. Příznaky trvaly čtyři dny, načež otok zmizel.

Zhodnocení výsledků a diskuse

Výsledky našich pokusů nasvědčují tomu, že choroba, označená jako „orchitida býků neznámého původu“, je infekčním onemocněním, které však pravděpodobně není, jak se předpokládalo jen chorobou býků. Experimentální přenos na jalovice a vyvolání akutních i chronických změn ve vagině a uteru dokazuje, že pokles procenta zabřezávání krav a jalovic v obvodech postižených inseminacních stanic nemusí být způsoben jen poruchou spermiogeneze a ztráty plodnosti býků, ale též změnami na pohlavním ústrojí krav a jalovic.

Stejně jako jiným autorům (6, 4, 11, 7 a 8) zdařila se i nám izolace agens, které se dá pasážovat na vejcích a vyvolává obdobné klinické i p. a. příznaky jako přirozená infekce. Změny popisované jimi na chorioalantoidních blanách infikovaných slepičích embryí nejsou nijak typické. Edematózní zduření chorioalantoidní blány se objevovalo v našich pasážích rovněž a mortalita embryí se v našich pokusech stabilizovala někdy již od druhé pasáže. Primoizolace infekčního agens z terénních případů jednoho nákazového ohniska se nám zdařila celkem 14krát. Mortalita embryí se objevovala již v prvních pasážích až do 10. pasáže pravidelně a v některých případech jsme mohli titrací *in ovo* stanovit hodnotu LD 50 %. Z ostatních autorů popsali konstantní hynutí embryí jen Kendrick a spol. (7), nedostatečně průkazné hynutí zaznamenal McClure (2).

Většina cizích autorů studovala epizootie virové sterility skotu v terénu a v pokusech o izolaci viru vycházeli z patologicko-anatomického materiálu získaného z jalovic. V našem případě jsme se zaměřili především na vyšetřování býků, u nichž byly klinické i patologicko-anatomické projevy choroby velmi výrazné. Přítomnost nákazy u krav a jalovic v terénu byla z počátku málo nápadná a nebyla jí věnována dostatečná pozornost.

Přesto, že klinické příznaky u přirozeně infikovaných a onemocnělých zvířat, popisované různými autory jsou dosti podobné, nelze podle literárních údajů, srovnávané-li je s našimi výsledky rozhodovat, zda se i u nás jedná o etiologicky shodné onemocnění. Z citovaných pramenů je zřejmé, že ani v cizině nejsou po-

pisované virové epizootie etiologicky jednotné. Rozdíly v klinickém a patologicko-anatomickém obraze popisovaných epizootií týkají se především změn na samčích genitálních, zatímco změny u přirozeně i uměle infikovaných krav a jalovic jsou vesměs stejné (*vaginitis*, *cervicitis* s mukopurulentním výtokem). Z o t o v (18) popisuje kromě toho u krav a jalovic chronické stadium s obrazem katarální endometritidy a salpingitidy. U jalovic, námi experimentálně infikovaných, jsme nacházeli za čtyři týdny po infekci rovněž *endometritis* s hlenohnisavým výtokem a cystózní degeneraci ovárií.

K bezpečnému průkazu virové etiologie a k přesné identifikaci agens pasážovaného na slepičích embryích chybí nám sérologický průkaz komplementfixačních a virusneutralizačních protilátek v sérech nemocných nebo experimentálně infikovaných zvířat. O sérologickém vyšetření se z citovaných autorů zmiňují jen M c. I n t o s h (6) a M i l l a r (11). Millar zaznamenal VK se séry nemocných zvířat vesměs negativní výsledky. Jen M c. I n t o s h a spol. (6) prokázali virusneutralizační protilátky v Africe u velkého počtu skotu, s klinickou diagnózou „Epivag“. Ve své pozdější práci (4) však pochybují, že by virus, který izolovali, byl totožný s virem epivagu. Naše orientační výsledky virusneutralizačních testů *in ovo* se séry nemocných býků byly negativní.

Stejně jako M c. I n t o s h a spol. (6), M i l l a r (11), M c. C l u r e (2) a hlavně K e n d r i c k a spol. (7, 8) provedli jsme i my za účelem průkazu specifity infekčního agens, izolovaného na vejcích, řadu pokusů o experimentální vyvolání onemocnění pohlavního ústrojí zdravých jalovic a býků. Biologický materiál (vaginální hlen, ejakulát, tkáň z varlat) z nemocných zvířat i materiál ze slepičích embryí, obsahující pasážované agens, vyvolal stejné klinické i patologicko-anatomické změny jaké jsou zjišťovány po přirozené infekci býků a jalovic. Zpětná izolace agens z experimentálně infikovaných zvířat a obdobné změny na chorioalantoidních blanách i mortalita slepičích embryí, objevující se již v prvních pasážích, stejně jako při primoizolacích z přirozených infekcí, dokazují, že příčinou onemocnění býků i jalovic je pravděpodobně virus. Také střídavé pasáže agens na vejcích a zvířatech s pozitivními nálezy klinickými i patologicko-anatomickými a virologickými tento názor podporují (viz přehled č. 1 a 2 a tabulku V a VI).

Vztah mezi onemocněním, které sledujeme, a mezi virovými chorobami pohlavního ústrojí, které popisují cizí autoři, není ještě po stránce klinické, epizootologické, ani etiologické objasněn. Zdá se, že výskyt virových infekcí pohlavního ústrojí není ani v našich zemích náhodný a epizootie, které se mohou objevit v terénu i na inseminačních stanicích, mohou se stát závažným hospodářským problémem.

Souhrn

Byla studována etiologie chronického granulačního zánětu varlat býků, který se enzooticky i sporadicky objevoval v inseminačních stanicích v českých zemích.

Infekční povaha onemocnění byla prokázána experimentálním přenosem na zdravé býky a jalovice.

Z 25 vzorků ejakulátů a varlat nemocných býků bylo celkem čtrnáctkrát izolováno na chorioalantoidních blanách slepičích embryí infekční agens, které vyvolávalo nepravidelné změny chorioalantoidních blan a usmrcovalo embrya po dvou- až šestidenní inkubaci. Zjištěná LD 50 % měla ve 4. až 8. pasáži hodnotu $10^{-4,5}$. Desetiprocentní suspenze chorioalantoidních blan ze 2. až 4. vaječné pasáže použita k experimentální infekci zdravých býků a jalovic vyvolala onemoc-

nění zcela shodné s onemocněním zvířat experimentálně infikovaných ejakulátem nebo suspenzí z varlat nemocných zvířat, i s onemocněním po přirozené infekci.

Přítomnost infekčního agens byla prokázána zpětnou izolací z orgánů experimentálně infikovaných zvířat, z ejakulátů varlat, vaginálního a děložního hlenu a z tekutiny získané punkcí ovariálních cyst.

Literatura

1. Blakemore F. citov. Mc. Intosh B. M.: J. S. Afr. Vet. Med. Ass. 23, 165-166, 1952. — 2. Mc. Clure T. J.: N. Z. Vet. J. 5: 68-70, 1957. — 3. Daubney R., Hudson J. R., Anderson J.: Citov. Mc. Intosh B. M. J. S. Afr. Vet. Med. Ass. 23, 165-166, 1952. — 4. Haig D. A., Mc. Intosh B. M.: Citov. Van Rensburg S. W. J. Brit. Vet. J. 109, 226-233, 1953. — 5. Henning M. W.: Citov. Kendrick J. W. a spol. JAVMA 128, 7, 357-361, 1956. — 6. Mc. Intosh B. M., Haig D. A., Alexander R. A.: J. S. Afr. Vet. Med. Ass. 23, 165-166, 1952. — 7. Kendrick J. W., Mc. Kercher D. G., Saito J.: JAVMA 128, 357-361, 1956. — 8. Kendrick J. W., Gillespie J. H., Mc. Entee K.: Cornell Vet. 48, 458-495, 1958. — 9. Kercher D. G., Straub O. C., Saito J. K., Wada E. M.: Canad. J. of Comp. Med. and Vet. Cs. 23, 320-328, 1959. — 10. Madin S. H., Andriese P. C., Darby N. B.: Am. Journ. Vet. Res. 18, 932-941, 1957. — 11. Millar P. C.: Brit. Vet. J. 111, 308-315, 1955. — 12. Purchase: Citov. Serov M. F., Pjankov B. F. Veterinarija 34, 88-92, 1957. — 13. Van Rensburg S. W. J.: Brit. Vet. J. 109, 226-233, 1953. — 14. Rumjancev N. V.: Zaraznyje bolezni krupnogo rogatogo skota, selchozgiz Moskva 1958, 36-40. — 15. Sakala J.: Veterinářství IX, 258-261, 1959. — 16. Serov M. F., Pjankov B. F.: Veterinarija 34, 88-92, 1957. — 17. Šetka R.: Veterinářství, IX, 18-22, 1959. — 18. Zotov A. P.: Infekcionnyje i invazionnyje bolezni krupnogo rogatogo skota Gos. izdat. sel'skochoz. liter. Moskva 1956, 218-220. — 19. Věžník Z.: Osobní sdělení 1959.

Изучение этиологии инфекционного орхита быков в Чехословакии

Изучалась этиология хронического гранулярного воспаления семенных желез быков, энзоотически и спорадически появляющегося на станциях искусственного осеменения в чешских областях.

Инфекционный характер заболевания был доказан экспериментальным перенесением болезни на здоровых быков и телок.

Из 25 проб эякулятов и семенников больных быков инфекционный фактор был четырнадцать раз изолирован на хориоалантоидных оболочках куриных эмбрионов, который и вызвал нерегулярные изменения хориоалантоидных оболочек и умерщвлял зародышей после 2—6-дневной инкубации. Установленные LD 50 % в 4—8 пассажах представляли величину $10^{-4.5}$. 10 % суспензии хориоалантоидных оболочек из 2—4 яичных пассажей, примененной для экспериментальной инфекции здоровых быков и телок, вызвали заболевание полностью сходное с заболеванием животных, инфицированных в экспериментальном порядке эякулятом или суспензией из семенников больных животных, а также и с заболеванием после естественной инфекции.

Присутствие инфекционного фактора доказано обратной изоляцией из органов экспериментально инфицированных животных, из эякулятов, семенников, вагинальной и маточной слизи и из жидкости, полученной при пункции кист яичника.

Studium der Ätiologie der ansteckenden Hodenentzündung der Bullen in der Tschechoslowakischen Republik

Studiert wurde die Ätiologie einer chronischen granulierenden Hodenentzündung bei Bullen, die in den Inseminationsstationen der böhmischen Länder enzootisch und sporadisch aufgetreten ist.

Der infektiöse Charakter der Erkrankung wurde mittels experimenteller Übertragung auf gesunde Bullen und Färsen nachgewiesen.

Aus 25 Proben des Ejakulats und der Hoden kranker Bullen wurde insgesamt vierzehnmal auf der Chorioallantois von Hühnerembryonen ein infektiöses Agens isoliert, das unregelmäßige Veränderungen an der Chorioallantois verursachte und die Embrya nach 2-6tägiger Inkubation abtötete. Die ermittelte LD 50 % betrug in der 4.—6. Passage $10^{4.5}$. Eine 10 % Suspension der Chorioallantois aus der 2.—4. Passage auf Hühnerembryonen rief bei experimenteller Infektion gesunder Bullen und Färsen eine sowohl mit der Erkrankung der mit dem Ejakulat oder mit Hodensuspension experimentell infizierten Tiere, als auch mit der nach natürlicher Infektion aufgetretenen Krankheit übereinstimmende Erkrankung hervor.

Die Anwesenheit eines infektiösen Agens wurde durch Rückisolation aus den Organen experimentell infizierter Tiere, aus dem Ejakulat, den Hoden, dem Vaginal- und Gebärmutter Schleim sowie aus der mittels Punktion von Ovarialzysten gewonnenen Flüssigkeit, nachgewiesen.

Éterový test v séru koní a moči psů

Эфирный тест в сыворотке лошадей и в моче собак

Der Äther-Test mit Pferdeserum und Hundeharn

Lubomír ŠLESINGR

Došlo dne 21. VII. 1958

Úvod

Žlučové pigmenty jsou mimo současný humánní výzkum také středem pozornosti na poli veterinární medicíny. Podkladem tohoto výzkumného směru jsou časté poruchy a choroby jaterní a cest žlučových.

Při detailním laboratorním vyšetřování krevního séra a moče pacientů s vyšším obsahem žlučových pigmentů byla nám nápadná vytřepatelnost žlučových pigmentů mimo chloroformu rovněž i do éteru. Tento poznatek nás přinutil zabývat se zmíněným úkolem podrobněji. K systematickému šetření jsme si zvolili sérum zdravých a nemocných koní a moče zdravých a nemocných psů.

Přehled literatury

V přehledu literatury uvádíme pouze práce zabývající se v éteru vytřepatelným žlučovým pigmentem u člověka. Z prací veterinárních jsme dosud v přístupné literatuře podobné nenašli.

Veškeré humánní práce jsou vesměs z poslední doby a lze je rozdělit na práce klinické a biochemické. Z roku 1951 je známa práce Ningra a Továrka (4), která zkoumá výskyt v éteru rozpustného bilirubinu u osob s rozličnými jaterními chorobami. Bylo prokázáno, že uvedený pigment se nevyskytuje pouze u osob s maligními jaterními změnami, nýbrž byl prokázán i u jiných jaterních chorob. Podobnou práci publikovali v roce 1955 Lepjavo (2) a Michajlova (3). Autorka jej zjišťovala při nádorech hlavy pankreatu a při změnách na *papila Vateri*. Doporučuje pigment zjišťovat nejen kvalitně, ale také kvantitativně. Příčinu hromadění se tohoto barviva v krvi spatřuje ve špatném odtoku žluče a pankreatických šťáv do dvanáctníku.

Vlastnosti éterem vytřepatelného bilirubinu popsal v roce 1956 Talafant (6). Na základě chemických rozborů prokázal, že tento pigment se chová

jako neobyčejně alkalicky-labilní ester nebo jiné velmi labilní složky bilirubinu. Dále prokázal elektroforeticky, že zmíněné barvivo není jednotné a že se skládá z dosud neznámých složek. Ve stejném roce pátral po uvedeném barvivu mimo sérum také v moči S a l o W e i n r a c h (5). Éterem vytřepatelný bilirubin zjistil autor také v moči. Autor našel pigment vedle maligních jaterních nádorů i u jiných jaterních chorob. B e c k a K ü h n (1) zkoumali rozpustnost bilirubinu v éteru v závislosti na pH prostředí. Zjistili, že při pH 8,8 se začíná bilirubin v éteru rozpouštět, při pH 5 je schopen všechen bilirubin rozpustný ve vodní fázi přejít do éteru. Hlavní vlastností éterem vytřepatelného bilirubinu však je jeho schopnost přecházet do éteru i za pH vyššího nežli 9. Tím se také liší mimo jiné vlastnosti od bilirubinu. Autorům se podařilo vytřepat éterem rozpustný pigment z ikterické moče při kyselém pH . Tento pigment však nezískali při zásaditém pH . Z dalších prokázaných vlastností je třeba ještě uvést, že je vázán na sérový albumin. Rovněž spektrofotometricky jsou markantní difference křivek mezi bilirubinem a éterem vytřepatelným pigmentem.

Z našeho hlediska je třeba ještě uvést citace M i c h a j l o v é (3b), která získala éterem vytřepatelný pigment při experimentálním podvázání *ductus chole-dochus* a *ductus pancreaticus* u pokusného psa.

Phylloerythrin je rovněž rozpustný v éteru, což prokázal P e r r i n (8). Do éteru však nepřechází anebo pouze v malém procentu při pH vyšším než 7,5. Phylloerythrin je ve vodě nerozpustný a je přítomen již ve žluči býložravců.

Metodika

Výskyt éterem vytřepatelného pigmentu jsme sledovali u zdravých a nemocných koní a psů. Sérum koní jsme volili pro jeho vysoký obsah bilirubinu již za normálních poměrů. Moč psů zase naopak pro běžný výskyt žlučových barviv při sebemenších zdravotních poruchách psů.

Sérum jsme získávali běžným odběrem krve z *vena jugularis*, ustáním a samovolným vytlačěním séra při pokojové teplotě. Reakci jsme prováděli se sérem dva dny starým. Z takového séra se nám podařilo získat vytřepatelnou frakci do éteru. Bylo-li použito čerstvého séra, vytřepala se v menší míře část bilirubinu do éteru, ale z éteru do 15 minut vymizela. Na tomto místě je třeba ještě upozornit na důležitost pH . Pracuje-li se s okyseleným sérem jsou získané výsledky jiné nežli uvádíme.

K séru jsme přidali dva díly éteru a třepali jsme po dobu jedné minuty. Předem však byla vždy provedena diázoreakce. Éter, do něhož přešla část barviva, jsme odlili do čisté zkumavky a abychom si ověřili zda jde o tzv. éterem vytřepatelný bilirubin, provedli jsme následující reakce: 1. zkoušku s diázotovaným azoreagens, 2. vytřepatelnost do zásady, 3. reakci s acetonem a 4. reakci s $n/10$ HCl (2., 3. a 4. — navrstvit a protřepat).

Moč jsme získávali katetrem nebo samovolně. Každý vzorek jsme okyselili kyselinou octovou a při pH 5,5 jsme provedli zkoušku na bílkoviny a žlučová barviva. Podotýkáme, že u moči, silně pozitivních na žlučová barviva při Gmelinově zkoušce, byla vždy prokázána přítomnost menšího nebo většího množství bílkovin. Moč byla třepána obdobně v poměru 1 : 2 s éterem. V éteru rozpustný bilirubin byl pak podroben již uvedeným dalším reakcím. Pracovali jsme s ranní čerstvou močí.

I. Éterový test v séru koní

	Diagnóza	Počet	Diazo v séru		Éterový test		s diazem		s acetonem		s $n/10$ HCl	Vytřepatel. do zásady
			přímá do 30 vt.	2 fáz.	+	-	+	-	+	-		
I.	Bez klinických příznaků	20	—	—	—	20	—	—	—	—	—	—
II.	Ikterus při klinických chorobách	9	1	8	6	3	—	—	—	—	—	6
III.	Koliky	15	—	2	—	—	—	—	—	—	—	—
IV.	Intoxikace	7	—	2	1	6	—	—	—	—	—	—
V.	<i>Bronchitis ac.</i>	8	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
VI.	<i>Hepatitis po CCl₄, phenylhydrazinu</i>	5	2	3	4	1	—	—	—	—	—	4

II. Éterový test v moči psů

	Diagnóza	Počet	Gmelinova zk.		Éterový test		Vytřepatelný do zásady	Reakce s		$n/10$ HCl
			+	-	+	-		diazem	acetonem	
I.	Bez klinických příznaků	20	1	19	—	20	—	—	—	—
II.	<i>Gastroenteritis ac.</i>	15	10	5	—	15	—	—	—	—
III.	<i>Hepatitis ac.</i>	10	10		8	2	—	5	—	—
IV.	Weilova choroba	2	2		2	—	—	2	—	—
V.	Chron. ekcem	15	6	9	1	14	—	—	—	—
VI.	<i>Febris c.</i>	15	8	7	2	13	—	—	—	—
VII.	<i>Diabetes mell.</i>	3	—	3	—	3	—	—	—	—

Výsledky u koní

K získání přehledu o výskytu éterem vytřepatelného žlučového pigmentu jsme provedli rovněž šetření u koní zdravých. U 20 šetřených sér zdravých koní byl éterový test i s ostatními společně provedenými reakcemi negativní. Také u koní nemocných kolikami (15) a akutní bronchitidou (8) byl test negativní. U koní nemocných druhotně ikterem (9), alimentárními intoxikacemi (7) a uměle vyvolanými záněty jater (5) byl éterový test jedenáctkrát pozitivní. U 10 koní byl negativní. Sérum koní, u nichž chorobný stav způsobil zvýšený obsah přímého i nepřímého bilirubinu, byla diázoreakce třikrát přímá, měřeno do 30 vteřin, a patnáctkrát dvoufázová. Ostatní provedené zkoušky s barvivem získaným v éteru byly negativní. U 10 zkoušek bylo možno pigment vytřepat do zásady.

Výsledky u psů

Šetření bylo provedeno v moči psů bez klinických příznaků (20) a psů nemocných těmito chorobami: *gastroenteritis acuta* (15), *hepatitis acuta* (H. c. c.) (10), Weil (2), *eczema chronicum* (15), *febris canum* (15) a *diabetes mellitus* (3).

Moč na éterem vytřepatelný pigment byla u chorých psů, kteří měli vysoký obsah bilirubinu v moči, rovněž u 13 pozitivní na tento pigment. Ani v jednom případě se nedal však vytřepat do zásady. Reakce s diázem byla sedmkrát pozitivní, při ostatních zkouškách barvivo nereagovalo.

Souhrn

Při hodnocení pravého éterového testu s diagnostickým využitím u jaterních chorob je podle dosavadních našich zkušeností v séru koní a moči psů naprosto nutné éterem vytřepatelné barvivo podrobit dalším zkouškám. V textu a v tabulkách uvedené zkoušky pomohou odlišit jiná barviva žlučová, která rovněž do éteru přecházejí. Z těchto barviv je to především nepřímý bilirubin, který se dá částečně éterem vytřepat. Éterem vytřepatelný pigment se odvozuje z větší části od nepřímého bilirubinu (Beck, Kühn). Z našeho hlediska je třeba opatrně hodnotit reakce hlavně u koní, kde je nepřímého barviva při chorobách krevních a jaterních v séru nadměrně. Shrňme-li celý problém zmíněného barviva můžeme jej charakterisovat takto: Pozitivní éterový test dává s diázem reakci, do zásady se nedá vytřepat, s $n/10$ HCl přechází v biliverdinoidní barvivo, s acetonem se v éteru vysráží a krystalizuje v jehličkovitých trsech. Éterosolubilní pigment snadno oxyduje.

Použijeme-li tohoto měřítka v našem průzkumu u koní, pak je třeba uvést, že z jedenácti zdánlivě pozitivních případů neodpovídá ani jeden požadavkům na toto barvivo kladeným. Vzhledem k tomu, že u 10 případů přešlo barvivo do zásady, soudíme, že šlo o nepřímý bilirubin, který se v éteru rovněž částečně rozpouští. Zkouška s acetonem a $n/10$ HCl byla vesměs negativní. Reakce diazová byla rovněž negativní, s éterovým extraktem se však diázo fialově zbarvilo za několik hodin u několika vzorků.

Soudíme proto, že jsme ani v jednom případě neprokázali u uvedených pacientů éterem vytřepatelný bilirubin.

Poměry s uvedeným testem v moči psů byly poněkud jiné. Ze 13 získaných extraktů dávalo sedm pozitivní diazoreakci. Do zásaditého prostředí nepřešel ani jeden vzorek. Z hlediska zmíněných dvou reakcí by získaný pigment odpovídal pravému éterem vytřepatelnému bilirubinu. S acetonem a $n/10$ HCl však barvivo sedmi psů reakci nedávalo. Neodpovídal tudíž éterový extrakt výsledkům podle Becka a Kühna. Přesto se však domníváme, že o uvedený pigment šlo, neboť se u těchto pacientů vyskytovala vážná bilirubinaemie a extrakt pak dával reakci s diazem a nepřecházel do zásady.

Literatura

1. K. Beck - H. Kühn: Über das Ätherlösliche Bilirubin. Kl. Wsch. 34, H. 23, 24, S. 630, 1956. — 2. A. G. Lepjanko: K otázce dif. dg. významu nálezu v éteru rozp. bilirubinu. Kliničes. med. 33, 3, s. 75, 1955. — 3. N. D. Michajlova: O původu a klin. významu éterem rozpustného bil. Kliničes. med. 33, 3, 1955. b) Sovetskaja med., 2, 11, 1952. — 4. E. Ninger, J. Továrek: The Ether Test and its Applicability in the dif. dg. of Jaudice. Ac. Med. Sc. Vol. 139, 3, 1951. — 5. Salo Weinrach: Test sencillo de obstruction biliar intensa bilirubina eter-extraible urinaria. La Prensa Medicina Argentina sv. 43, č. 32, s. 2, 425, 1956. — 6. E. Talafant: The Nature of Ether-Extractable Ble Pigment of Blood Serum. Acta Medica Scandinavica. Vol. CLIV, fasc. IV, 1956. — 7. T. K. With: Biology of Bile Pigments. S. 28, 1954. — 8. Perrin: The Form in which Phylloerythrin Occurs in Bile and Blood. The Biochem Journ., V. 68, No. 2, s. 318, 1958.

Эфирный тест в сыворотке лошадей и в моче собак

Труд описывает наличие билирубина у лошадей и собак, который можно экстрагировать эфиром.

Указанный пигмент не удалось доказать в сыворотке лошадей, даже если у последних и наблюдалась сильная билирубинемия. Эфиром экстрагируемая вытяжка, как было доказано у лошадей, не была настоящей.

В 7 случаях у больных собак был доказан пигмент, который можно экстрагировать эфиром и который давал позитивную диазореакцию и не переходил в щелочь. Этот пигмент считается эфиром экстрагируемым.

Принимая во внимание, что у собак можно, в первую очередь, установить желчные красящие вещества в моче, и только при весьма серьезных и прогрессирующих заболеваниях печени наступает билирубинемия, можно эфирный тест использовать для диагностики болезней печени у собак.

Der Äther-Test mit Pferdeserum und Hundeharn

In der Arbeit ist das Vorkommen des mittels Äther extrahierbaren Bilirubins bei Pferde und Hunden beschrieben. Es ist nicht gelungen, den Farbstoff im Serum der Pferde nachzuweisen, auch wenn es sich um Fälle mit hoher Bilirubinämie han-

delte. Hiemit ist erwiesen, daß der Farbstoff bei Pferden nicht mittels Äther extrahierbar ist.

Bei 7 kranken Hunden ist der Farbstoff im Harn nachgewiesen worden. Er gab eine positive Diazo-Reaktion und ist nicht in die 1 % NaOH-Lösung übergegangen.

Da die Gallenfarbstoffe bei Hunden hauptsächlich im Harn vorkommen und nur bei ersten Leberschäden Bilirubinämie auftritt, ist die Möglichkeit gegeben, den Äther-Test zur Diagnostik der Leberkrankheiten anzuwenden.

- Pleva V., Harnach R., Mesároš E.: Použití perlového testu v diagnostice *Bacillus anthracis*
 Применение жемчужного теста в диагностике сибирской язвы (*Bacillus anthracis*)
 Anwendung des Perltests in der Diagnostik des *Bacillus anthracis* 675
- Boháč J., Menšík J., Šetka R.: Studie o etiologii infekční orchitidy býků v ČSSR
 Изучение этиологии инфекционного орхита быков в Чехословакии
 Studium der Ätiologie der ansteckenden Hodenentzündung der Bullen in der Tschechoslowakischen Republik 685
- Šlesinger L.: Ěterový test v séru koní a moči psů
 Эфирный тест в сыворотке лошадей и в моче собак
 Der Äther-Test mit Pferdeserum und Hundeharn 704

Sborník ČSAZV - Veterinární medicína vydává Československá akademie zemědělských věd. Uveřejňuje studie, rozborů a vědecká pojednání o vyřešených úkolech výzkumu v oboru veterinární medicíny. — Vychází měsíčně. — Celoroční předplatné 120 Kčs. — Redakce Praha 2, Slezská 7, telefon 577-51, 575-41. — Rozšiřuje Poštovní novinová služba. Objednávky přijímá každý poštovní úřad i doručovatel. — Vytiskl Mír, novinářské závody, n. p., závod 2, provozovna 22, Legerova 22, Praha 2.

A-19*01558

Sborník ČSAZV — Veterinární medicína

upozorňuje své čtenáře na tematické číslo o **chorobách drůbeže**, které vyjde jako č. 10/60. V rámci zvyšující se životní úrovně obyvatelstva je třeba, aby naše zemědělská výroba dodávala stále větší množství drůbežího masa. Jedním ze základních předpokladů je zdravý chov drůbeže. Jmenované tematické číslo bude proto jistě vítanou pomůckou jak pro veterinární lékaře, tak pro všechny pracovníky v chovu drůbeže.

Jde o tyto práce:

- O. J. Vrtiak, J. Zapletal:* Príspevok k lyofilizácii H-vírusu a jeho použití
- B. Klimeš, B. Krůza, B. Tesarčík:* Terapie pulorové nákazy furazolidonem a jeho vliv na serologické reakce
- P. Mach, J. Surynek, V. Školný:* Červený krevní obraz u kuřat celotělově ozářených Rtg paprsky
- P. Mach, J. Surynek, V. Jandl:* Bílý krevní obraz u kuřat celotělově ozářených Rtg paprsky
- B. Klimeš, M. Dvořák:* Hemoglobin a hladina železa v krevní plasmě drůbeže po aplikaci železa
- B. Klimeš, V. Celer:* Krevní obraz při tuberkulóze drůbeže
- D. Zajíček:* Příspěvek k druhovému výskytu a patogenéze hlístic rodu *Amidostomum* Railliet et Henry 1909 (Nematoda)
- Z. Kožešník:* K otázce výskytu ornitózy v pardubickém kraji
- V. Šerý:* Ornitóza a salmonelóza u volně žijících ptáků v přírodní rezervaci a u drůbeže a lidí v nejbližším okolí.

Objednávky zasílejte na adresu:

ČESKOSLOVENSKÁ AKADEMIE ZEMĚDĚLSKÝCH VĚD

propagace — vydavatelství

Praha 2 - Vinohrady, Slezská 7