

ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ
MINISTERSTVA ZEMĚDĚLSTVÍ,
LESNÍHO A VODNÍHO HOSPODÁŘSTVÍ

Veterinární medicína

3

ROČNÍK 8 (XXXVI) – PRAHA, KVĚTEN 1963

CENA 10 Kčs

ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ
MINISTERSTVA ZEMĚDĚLSTVÍ,
LESNÍHO A VODNÍHO HOSPODÁŘSTVÍ
VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Řídí redakční rada: *prof. MVDr. Emanuel Král (předseda), akad. Ivan Brauner, MVDr. Jan Čarvaš, doc. MVDr. Jaroslav Dražan, doc. MVDr. Tomáš Gdovin, MVDr. Martin Lis, MVDr. Andrej Mačička, MVDr. Ladislav Polák, doc. MVDr. Oldřich Svoboda, MVDr. Jan Šnoflák, doc. MVDr. inž. Jan Vlček, pplk. MVDr. Miroslav Vojáček, MVDr. Ladislav Zima. — Vedoucí redaktor František Němec.*

© Ústav vědeckotechnických informací MZLVH, Praha 1963

Obsah - Содержание - Inhalt - Content - Contenu

Vlček J.: Sdružené očkovací látky v prevenci chorob	143
Mádr V.: Vakciny proti Kloboukově nemoci z viru pomnoženého na buněčných kulturách Вакцины против болезни Клобука из вируса, размноженного на клеточных культурах Vakzinen gegen die Kloboukische Krankheit aus dem auf den Zellkulturen vermehrten Virus Vaccines against Klobouk's Disease from Virus cultivated on Tissue Cultures	145
Hubík R.: Kultivace viru slintavky na přežívajících sliznicích z hovězích jazyků podle metody Frenkelovy Культивирование вируса ящура на переживающих слизистых оболочках языка крупного рогатого скота по методу Френкеля Die Kultivation des Virus der Maul- und Klauenseuche auf überlebenden Schleimhäuten von Rinderzungen nach der Methode von Frenkel	153
Rossi L.: Sdružená vakcinace bivalentní vakcínou proti moru a července prasat Объединенная вакцинация двухвалентной вакциной против чумы и рожи свиней Die gleichzeitige Vakzinierung mit bivalenter Vakzine gegen Schweine-rotlauf und Schweinepest	165
Novák Z., Žuffa A., Zámečník A.: Trvanie imunity po jednorázovom očkovaní živou WR 2 vakcínou proti červienke ošípaných Продолжительность иммунитета после разовой прививки живой неvirulentной вакциной против рожи свиней Die Immunitätsdauer nach einmaliger Impfung mit lebendiger avirulenter Vakzine gegen den Rotlauf	173

Vakciny proti Kloboukové nemoci z viru pomnoženého na buněčných kulturách

Вакцины против болезни Клобука из вируса, размноженного на клеточных культурах

Vakzinen gegen die Klobouk'sche Krankheit aus dem auf den Zellenkulturen vermehrten Virus

Vaccines against Klobouk's Disease from Virus cultivated on Tissue Cultures

MVDr. Vojtěch MÁDR

Bioveta, vedoucí národní podnik, Ivanovice na Hané, ředitel MVDr. V. Marjáněk

Úvod

Objevení možnosti pomnožování viru Kloboukovy nemoci (KN) na tkáňových kulturách z epitelu vepřových ledvin (Larski 1955) bylo významným objevem, který zasáhl do všech oblastí studia viru. Přirozeným vyvrcholením pomnožovacích pokusů je snaha o přípravu očkovací látky z uměle získaného viru. V uplynulých letech byly sneseny četné důkazy o vhodnosti tohoto antigenu k aktivní imunizaci — Mayr (1958a), Patočka a spol. (1958), Bourdin a Serres (1959), Mádr (1960) aj. Usilujeme o pronikavé zlevnění výroby vakcíny a doufáme, že se nám podaří další zkvalitnění imunizace proti KN.

Jako u všech veterinárních vakcín, musí i zde mít výrobce na mysli, kromě nezbytné účinnosti, neškodnosti a dlouhodobé stability, že vakcína musí být vhodně konzervována, aby se omezila možnost její kontaminace během hromadné preventivní vakcinace, dále, aby vakcína byla snadno aplikovatelná, byla použitelná ke sdružené, případně bivaletní vakcinaci a aby vytvářela dostatečnou imunitu již po jednorázové aplikaci.

V předcházející práci — Mádr (1960) — bylo referováno o vývoji vakcín proti Kloboukové nemoci z buněčných antigenů v pobočce Biovety v Opavě. Autor se zde zaměřil jednak na fenolizovanou adsorbátovou vakcínu a na vakcinaci apatogenní variantou viru KN získanou pasáží viru na buněčných kulturách z vepřových ledvin.

Konzervace viru fenolem byla zvolena proto, že fenol je tradičním veterinárním desinfekčním prostředkem a v koncentraci do 0,5 % je vhodnou konzervační přísadou pro vakcíny a séra. Fenol má kromě toho slabý inaktivační účinek na virus KN, a proto si virus ve vakcíně dlouho uchovává svou životnost a imunizační vlastnosti.

V posledních letech je stále větší pozornost zaměřována na apatogenní varianty virů. U původce Kloboukovy nemoci byla již řada těchto kmenů izo-

lována a zkouší se jejich vhodnost k aktivní imunizaci. Mayr (1958b, 1959), Szurman a Larski (1960), Mádr (1960).

Úkolem této práce je referovat o výsledcích dílčích imunizačních pokusů s fenolizovanou adsorbátovou vakcínou a s apatogenní variantou viru KN.

Vlastní práce

Metody a materiál

K přípravě vakcín byl používán virus KN kmenů Zábřeh a Praha pomnožený na jednovrstevných buněčných primokulturách (BK) vepřových ledvin. Titr TCD₅₀ viru kolísal mezi 10⁻⁶ až 10^{7,5}/ml. Fenolizovaná adsorbátová vakcína byla vyráběna z viru vyšších pasáží na BK. Patogenita viru byla oslabena natolik, že po i. c. aplikaci vyvolal jen lehké onemocnění s inaparentním průběhem, nebo nedošlo vůbec k onemocnění. Virus byl vázán na hydroxyd hlinitý a konzervován fenolem v koncentraci 0,4 %. Apatogenní varianta viru byla k imunizaci používána v nativním stavu bez konzervačních a adjuvančních přísad. Varianta byla získána z kmene Zábřeh a k imunizačním pokusům byla použita 120. pasáž na BK.

Vakcíny byly po vyrobení a přezkoušení sterility aplikovány skupinám selat v počtu 6 až 10 kusů. Selata o váze 15–20 kg byla vybírána z chovů zaručeně prostých KN a předem byla vyšetřena na přítomnost seroneutralizačních protilátek.

Imunita byla prověřována přímou metodou — intracerebrální infekcí — pokusných selat konstantní dávkou viru 15–25 ID₅₀ v mozkomíšni emulzi. Infekce byla prováděna za 4 týdny po imunizaci, paralelně byla vždy infikována skupina kontrolních selat stejného původu. Po infekci byla selata klinicky sledována a onemocnělá byla porážena. Kritériem onemocnění byly plně vyvinuté příznaky paralytické formy infekční obrny. Pozorovací doba byla po dřívějších zkušenostech zkrácena na 21 dnů, vzhledem k tomu, že v pozdější době se již případy onemocnění u vakcinovaných selat nevyskytovaly. Procento onemocnění selat v jednotlivých pokusných skupinách bylo graficky zaznamenáváno a srovnáváno se skupinou kontrolní.

I když tuto metodu zjišťování účinnosti vakcíny proti KN není možno považovat za optimální, jelikož jde o nepřirozený způsob aplikace poměrně vysoké dávky viru přímo do predilekčního místa, byla metoda přesto použita, neboť prokazuje vytvoření solidní imunity. Procento odolných selat v pokusech uváděné je třeba chápat jako imunitní index, který nelze ztotožňovat se skutečnou odolností v přirozených podmínkách. Má se za to, že vakcíny, u kterých odolá touto metodou více než 50 % selat, jsou vysoce účinné, mezi 50 % až 30 % méně účinné a pod 30 % nedostatečně účinné.

Před infekcí byla pokusným selatům vždy odebírána krev k seroneutralizačním testům. O výsledcích sérologického vyšetření bude referováno v jiném sdělení.

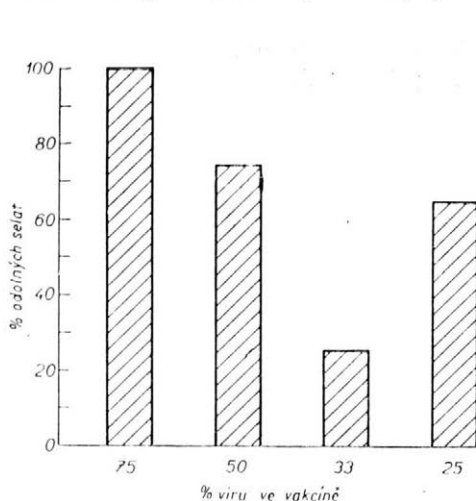
Výsledky pokusů

1. Fenolisovaná adsorbátová vakcína

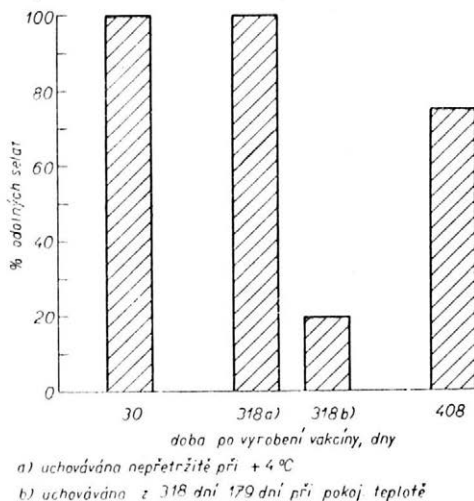
Především bylo nutno zjistit jaké množství antigenu ve vakcíně povede k vytvoření dostatečné imunity. Byly připraveny vakcíny s 25, 33, 50, a 75 % antigenu. U 25 až 50%ních vakcín byl virus absorbován na 50 % Al(OH)₃, zbý-

vající objem byl vždy doplněn fyziologickým roztokem. Vakcína se 75 % BK viru obsahovala 25 % absorbentia. Konzervace byla vždy provedena s 0,4% koncentrací fenolu. Vakcíny byly aplikovány subkutánně skupinám selat po 8 kusech.

Po i. c. infekci pokusných skupin (viz graf čís. 1) došlo k pozoruhodným výsledkům. Selata imunizovaná 75%ní vakcínou odolala všechna, selata vakcinovaná 50%ní vakcínou onemocněla 2 z 8. Protichůdných výsledků bylo dosaženo s 25 a 33%ními vakcínami. Zatímco ze skupiny selat imunizovaných 33%ní vakcínou onemocnělo 6 z 8 kusů, ze selat imunizovaných 25%ní vakcínou onemocněla pouze 2 ze 7 kusů (jedno sele uhynulo z jiných příčin).



Graf 1.



Graf 2.

Z pokusu vyplývá, že selata imunizovaná 75%ní a 50%ní vakcínou získávají vysokou odolnost proti KN, imunizace vakcínami, které obsahují méně než 50 % viru nemusí vést vždy k vytvoření dostatečné imunity.

Doba použitelnosti fenolizované vakcíny byla sledována u dvou šarží, které měly po vyrobení 100%ní účinnost. Vakcíny byly uloženy v chladírně při +4°C a v určitých intervalech po vyrobení byla prověřována jejich účinnost.

Vakcína s 75 % antigenu (graf čís. 2) si udržela svou vysokou účinnost i po 318 dnech, byla-li nepřetržitě uložena v chladírně. Vakcína téže šarže vyjmutá na 179 dní z chladírny a uložená v laboratoři, měla za 318 dní po vyrobení pouze 20%ní účinnost. Po 408 dnech soustavného uložení při +4°C došlo k nepříliš podstatnému snížení účinnosti na 75 %.

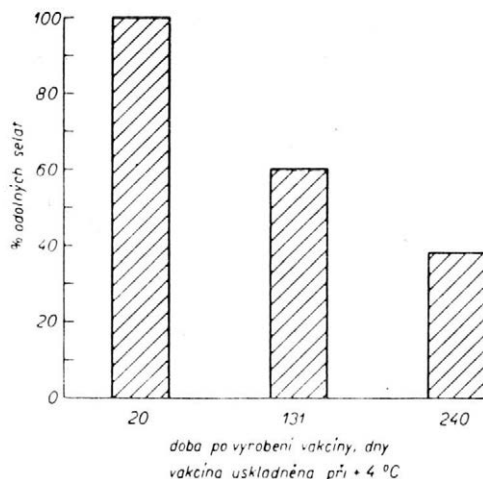
U druhé vakcíny vyrobené z 50 % BK viru docházelo ke ztrátě účinnosti vakcíny mnohem rychleji, než u vakcíny 75%ní, sestup účinnosti byl úměrný době uložení. (Graf čís. 3.) Po 131 dnech došlo ke snížení účinnosti na 60 % a za 240 dní již pouze na 37,5 %.

Tyto pokusy potvrzují domněnku, že doba účinnosti fenolizované vakcíny je závislá na množství viru obsaženého ve vakcíně a na způsobu a délce uložení. Pokusy umožňují stanovit praktický závěr, že pro fenolizovanou vakcínu lze určit delší expirační dobu než pro dosud užívanou formol-adsorbátovou vakcínu.

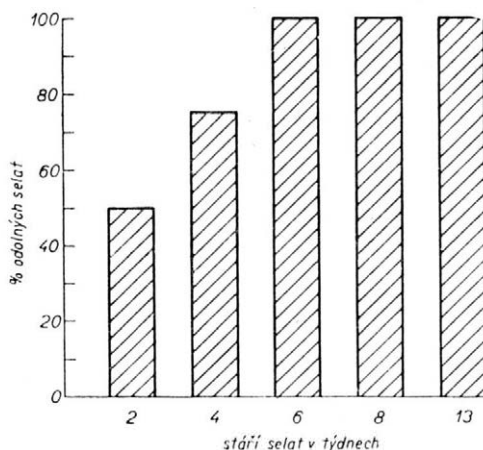
V praxi se často vyskytuje otázka v jakém stádiu očkovat selata ohrožená infekční obrnou. Je známo, že nejvíce vnímavá jsou selata v době po odstavu ve stáří 2 až 4 měsíce. Bylo by proto vhodné očkovat selata ještě před odstavem, aby byla imunní dříve než dospějí do kritického období. Proti tomu jsou námitky, že sele není schopné vytvářet v prvních týdnech života imunitu v dostatečné výši.

K objasnění tohoto problému byly experimentálně naočkovány skupiny selat různého stáří fenolizovanou adsorbátovou vakcínou. Výsledky imunizačních pokusů

(graf čís. 4) překvapivě ukazují, že již dvoutýdenní selata jsou schopna vytvářet dosti vysokou imunitu proti KN (50 %). Selata čtyřtýdenní byla imunní již na 75 % a od 6. týdne vytvářejí imunitu stejně vysokou (100 %) jako selata odstavená. Závěrem je možno tedy doporučit vakcinaci proti KN již v období sání ve stáří 4 až 6 týdnů.



Graf 3.



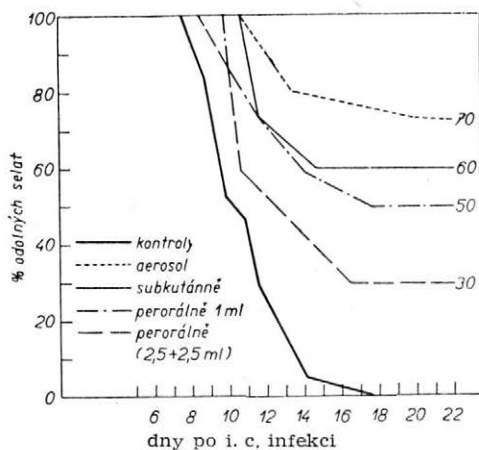
Graf 4.

2. Apatogenní varianta viru Kloboukovy nemoci

Použití apatogenní varianty k aktivní imunizaci nabízí kromě ekonomického efektu i možnost hromadné aplikace enterální případně nasální cestou. Očekává se také, že některý ze způsobů imunizace živým virem povede k vytvoření hlubší imunity než po subkutánní aplikaci jakékoliv vakcíny inaktivované.

V našich pokusech šlo především o to, získat přehled o účinnosti apatogenní vakcíny podané subkutánně, perorálně a inhalačně aerosolem.

Subkutánní aplikace byla provedena 5 ml BK viru 120. pasáže do předkolenní řasy. Perorální způsob byl zkoušen dvěma způsoby a to v prvním případě 1 ml na kus, v druhém případě 2,5 ml na kus. Imunizace 1 ml byla provedena jednorázově, imunizace 2,5 ml byla po 7 dnech opakována. Virus byl vždy celé skupině podán hromadně v emulzi sušeného mléka před krmením a bylo dbáno, aby se všechna selata rovnoměrně napila. Aerosolová aplikace byla prováděna inhalační mlhy vyvolané rozptylovacím aparátem. Na každé sele bylo v prostoru průměrně rozptýleno 10 ml viru. Selata byla k inhalaci umístěna v uzavřené místnosti po dobu 4 hod. Inhalace byla po 14 dnech opakována.



Graf 5.

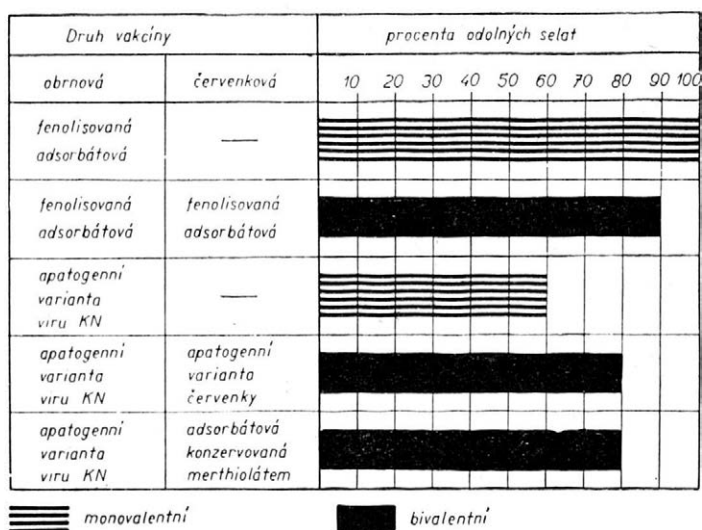
Výsledky pokusu znázorněné na grafu čís. 5 ukazují, že po s. c. aplikaci apatog. varianty vzniká dosti silná imunita (60 %), překvapivě vysokou imunitu vytvořila selata po inhalaci rozptýleného viru (70 %). Nevysvětlen zůstává paradoxně rozdílný výsledek perorální aplikace viru ve dvou použitých způsobech. Zatímco po podání 1 ml viru došlo k vytvoření poměrně dobré imunity (50 %), dvojnásobné podání 2,5 ml viru v týdenním intervalu vedlo ke vzniku slabé imunity (30 %). Domníváme se, že byl buď zažívací trakt selat pokusné skupiny

interferován některým z enterovirů nebo po opakovaném podání velké dávky viru došlo k senzibilizaci organismu pro následnou infekci. Při srovnání subkutánní a perorální imunizace bylo dosaženo shodných výsledků s Mayrem (1959), který rovněž po perorální imunizaci dosahoval nižšího procenta chráněnosti než po aplikaci subkutánní.

3. Bivalentní vakcinace proti KN a července

Důležitým praktickým požadavkem na všechny veterinární očkovací látky, zejména na vakcíny proti nákazám vepřů, je, aby byly vhodné k bivalentní vakcinaci. U vakcín proti KN přichází především v úvahu kombinace s vakcinou proti července vepřů.

Orientačně byla zjišťována možnost bivalentní vakcinace proti obrně a července jak fenolizovanou adsorbátovou vakcinou tak živou apatogenní variantou viru KN. Ke kombinaci s fenolizovanou vakcinou byla použita fenolizovaná vakcína proti července, ke kombinaci s apatogenní variantou viru KN byla použita jednak apatogenní varianta *B. rhusiopathiae suis*, jednak adsorbátová vakcína inaktivovaná mertiolátem. Jak ukazuje graf čis. 6, imunita proti KN nebyla po vakcinaci kombinovanou fenolizovanou vakcinou téměř dotčena. U apatogenní varianty došlo při kombinaci s oběma druhy červenkových vakcín ke zvýšení imunizačních schopností vůči KN. Imunita proti července byla ve všech případech méně uspokojivá. Negativním faktorem proti července zde je zřejmě poměrně vysoký obsah antibiotik (penicilin + streptomycin) ve virovém prostředí.



Graf 6.

Souhrn

V práci byly zkoušeny imunizační schopnosti fenolizované adsorbátové vakcíny proti Kloboukově nemoci a apatogenní varianty viru KN. Antigen byl získáván pomnožením na jednovrstevných buněčných kulturách vepřových ledvin.

U fenolizované vakcíny bylo zjišťováno optimální množství viru ve vakcíně. Pokus ukázal, že vakcíny s 50% a 75% obsahem viru (při titru TCD₅₀ 10⁻⁶ až 10^{-7,5} při imunizační dávce 5 ml na kus vytváří spolehlivou imunitu.

Délka použitelnosti vakcín byla pokusně sledována u dvou vakcín a bylo stanoveno, že vakcína s obsahem viru 75 % si udržuje vysokou účinnost, byla-li uchovávána při teplotě +4° C, až 408 dní. U vakcíny s 50 % viru dochází

k rychlejšímu poklesu imunizačních schopností, přesto byla vakcína dostatečně účinná ještě po 131 dnech.

V dalším pokuse byl sledován vliv stáří na stupeň vytvořené imunity. Experimentálně bylo prokázáno, že již 4 až 6týdenní selata jsou schopna vytvořit po jednorázové imunizaci fenolizovanou vakcínou velmi dobrou imunitu.

Apatogenní varianta viru KN byla aplikována podkožně, perorálně a dýchacími cestami — aerosolem. Bylo zjištěno, že podkožní a inhalační imunizace byla vysoce účinná, méně zdařilá byla imunizace enterální.

Při bivalentní vakcinaci společně se speciálně připravenými červenkovými vakcínami prokázaly jak fenolizovaná, tak apatogenní vakcína přibližně stejně vysokou odolnost proti Kloboukově nemoci jako po monovalentní vakcinaci.

Došlo dne 20. 6. 1962

Literatura

Bourdin a Serres (1959): Ann. Inst. Pasteur, 1959, 97, 583. — Larski (1955): Medycyna weterynaryjna, 1955, 11, 589. — Mádr (1960): Referát na sympoziu o Kloboukově nemoci, Brno, 1960. — Mádr (1961): Veterinární medicína, 1961, 6, 108. — Mayr (1958a): Ztbl. f. Bakt. Parasit. Infektionskr. u Hyg. 172, 465. — Mayr (1958b): Mh. Thk., 1958, 8, 49. — Mayr (1959): Ztbl. f. Bakt. Parasit. Infektionskr. u Hyg., 1959, 176, 341. — Patočka a spol. (1958): Čs. epidemiol. a mikrobiol. 1958, 7, 73. — Szurman a Larski (1960): Medycyna weterynaryjna, 1960, 16, 325.

Вакцины против болезни Клобука из вируса, размноженного на клеточных культурах

В работе исследовались иммунизационные способности фенолизированной адсорбатной вакцины против болезни Клобука и непатогенные варианты вируса БК. Антиген получался путем размножения на однослойных культурах свинных почек.

У фенолизированной вакцины было установлено оптимальное количество вируса в вакцине. Опыт показал, что вакцины с 50 % и 75 %-ным содержанием вируса (при титре TCD₅₀ 10⁻⁶ до 10^{-7,5}) при иммунизационной дозе 5 мл на голову образует надежный иммунитет.

Продолжительность применимости вакцин в опытном порядке наблюдалась у двух вакцин и было установлено, что вакцина с содержанием вируса 75 % сохраняет высокую эффективность, если ее хранить при температуре +4° С, до 408 дней. У вакцины с 50 % вируса иммунизационные свойства утрачиваются быстрее, но, несмотря на это, вакцина была еще достаточно эффективной по истечении 131 дня.

В дальнейшем опыте наблюдалось влияние возраста на степень образовавшегося иммунитета. Экспериментально было доказано, что уже 4—6 недельные поросята могут приобрести после разовой иммунизации фенолизированной вакциной весьма надежный иммунитет. Непатогенный вариант вируса БК применялся подкожно, перогольно и через дыхательные пути — aerosolem. Было установлено, что подкожная и ингаля-

ционная иммунизация высокоэффективны, менее успешной была энтеральная иммунизация.

При двухвалентной вакцинации вместе со специально приготовленными противорожистыми вакцинами доказали как фенолизованная, так и непатогенная вакцина примерно одинаково высокую стойкость против болезни Клобука, как и после одновалентной вакцинации.

Vaccines against Klobouk's Disease from Virus cultivated on Tissue Cultures

Report of a trial to determine the immunizing faculties of a phenolized adsorbate vaccine against Klobouk's disease and of an apathogenic strain of the virus of Klobouk's disease. The antigen was obtained by cultivating the virus on monolayer tissue culture with swine kidneys.

The phenolized vaccine showed an optimal amount of the virus. The vaccines containing 50 and 75 % of the virus (with a titre of TCD₅₀ 10⁻⁶ till 10^{-7,5}) applied in the dosis of 5 ml gave a sufficient immunity.

Trials to determine the period of employment of two vaccines showed, that the vaccine containing 75 % of the virus remained highly effective, if stored at +4° C, till the 408th day. The effectivity of the vaccine containing 50 % of the virus decreased in a somewhat shorter time, but was sufficiently effective already after 131 days.

Examined was also the influence of age upon the grade of the acquired immunity. It was proved, that 4—6 weeks old piglets develop after one application of the phenolized vaccine a very satisfactory immunity.

The apathogenic strain of the virus of Klobouk's disease was applied subcutaneously, perorally and into the respiratory tract by aerosol. The subcutaneous and inhalatory application was effective in a high degree, less effective was the enteral application.

After bivalent vaccination together with a special erysipelas vaccine the phenolized and also the apathogenic vaccine produced approximatively the same high degree of immunity against the Klobouk's disease like the monovalent vaccines.

Vakzinen gegen die Klobouk'sche Krankheit aus dem auf den Zellenkulturen vermehrten Virus

In der Arbeit wurden die immunisierenden Fähigkeiten der phenolisierten Adsorbatvakzine gegen Klobouk'sche Krankheit und die apathogenen Varianten des KK-Virus geprüft. Das Antigen wurde mittels vermehrung auf den einschichtigen Schweinenieren-Kulturen gewonnen.

Bei der phenolisierten Vakzine wurde eine optimale Virusmenge in der Vakzine festgestellt. Der Versuch zeigte, daß die Vakzinen mit 50% und 75% Virusgehalt (beim Titer TCD₅₀ 10⁻⁶ bis 10^{-7,5}) bei der Immunisierungsgabe 5 ml pro Stück eine verlässliche Immunität schaffen.

Die Verwendbarkeitsdauer von Vakzinen wurde versuchsmäßig bei zwei Vakzinen verfolgt, und es wurde festgelegt, daß die Vakzine mit dem 75% Virusgehalt eine hohe Wirksamkeit beibehält, wenn sie bei der Temperatur von $+4^{\circ}\text{C}$ bis zu 408 Tage erhalten blieb. Bei der Vakzine mit dem 50% Virusgehalt kommt es zu einer schnelleren Senkung der Immunisierungsfähigkeiten. Trotzdem war die Vakzine noch nach 131 Tagen ausreichend wirksam.

Im weiteren Versuch verfolgte man den Einfluß des Alters auf die Stufe der geschaffenen Immunität. Es wurde experimentell nachgewiesen, daß schon die 4—6 Wochen alten Ferkel imstande sind, nach einmaliger Immunisierung mittels phenolisierter Vakzine eine gute Immunität zu bilden.

Die apathogene Variante des KK-Virus wurde subkutan, peroral und mittels Atemwegen — durch Aerosol — appliziert. Es wurde festgestellt, daß die subkutane und Inhalierungsimmunisation hoch wirksam war; weniger gelungen war die Enteralimmunisation.

Bei der bivalenten Vakzination, gemeinsam mit den speziell hergestellten Rotlaufvakzinen, wies sowie die phenolisierte als auch die apathogene Vakzine beiläufig ebenso hohe Widerstandsfähigkeit gegen die Klokouk'sche Krankheit als nach der monovalentem Vakzination auf.

Kultivace viru slintavky na přežívajících sliznicích z hovězích jazyků podle metody Frenkelovy

Культивирование вируса ящура на переживающих слизистых оболочках языка крупного
рогатого скота по методу Френкеля

**Die Kultivation des Virus der Maul- und Klauenseuche auf überlebenden Schleim-
häuten von Rinderzungen nach der Methode von Frenkel**

MVDr. Rudolf HUBÍK
Bioveta n. p. Terezín, ředitel MVDr. Rudolf Dombek

Ú v o d

Systematický boj proti slintavce je jedním z nejvážnějších úkolů veterinární služby každého vyspělého státu. Ochrana před zavlečením slintavky a její tlumení v případě výskytu musí být prováděno komplexně s využitím všech nejnovějších poznatků a prostředků, které jsou k dispozici.

Jednou z důležitých zbraní proti této nákaze je účinná aktivní imunizace vnímavých zvířat. V posledních letech se této metody používá u nás se stále větší důsledností a každoročně prováděná preventivní vakcinace vytváří široké ochranné pásy z plně imunního skotu v oblastech nejvíce ohrožených touto nákazou. Toto opatření se podle dosavadních zkušeností ukazuje jako účinný prostředek proti epizootickému rozšíření slintavky. V případě vzniku slintavkového onemocnění se provádí velmi rychle široká okružová vakcinace, která ve spojitosti s důslednými protinákazovými opatřeními zajišťuje poměrně velmi spolehlivou ochranu proti dalšímu rozvlékání nákazy.

Očkovací akce proti slintavce vyžadují přirozeně výrobu značného množství vakcín. Až dosud byla v ČSSR vyráběna protislintavková vakcína z infekčního materiálu, získaného umělou infekcí plně vnímavého skotu. Tento způsob výroby infekčního materiálu je velmi nákladný, a to zvláště v důsledku velmi přísných a důkladných ochranných opatření a omezení k zajištění tohoto rozsáhlého provozu po stránce bezpečnosti proti možnostem rozvlékání nákazy.

Značné náklady a riziko této výroby je ovšem na druhé straně vyváženo vysokou hodnotou vakcín z tohoto viru, která vytváří u očkovaného skotu dlouhodobou a solidní imunitu. Tato skutečnost zajišťovala proto vakcíně tohoto typu tak široké a dlouholeté uplatnění v mnohých státech světa.

Se stoupajícím rozsahem preventivní vakcinace je však postupně omezována kapacita této výroby v důsledku stoupajících potíží při výběru dostatečného počtu plně vnímavých zvířat pro produkci viru. Rovněž tak rychlý vývoj nových me-

tod ve virologii vytváří předpoklady pro využití nových zdrojů virového materiálu pro výrobu očkovacích látek.

Vážné ohrožení našeho státu v r. 1960 slintavkovou nákazou si vynutilo okamžitá opatření k zajištění nových možností pro přípravu slintavkového viru k výrobě účinné vakcíny.

V tomto směru se ve světě uplatnily v posledních letech dva způsoby, a to kultivace viru slintavky na přežívajících sliznicích z hovězích jazyků a kultivace na jednovrstevných kulturách z hovězích a prasečích epiteliálních buněk. V této práci jsme se zaměřili na urychlené ověření vhodnosti a použitelnosti Frenkelovy metody pro eventuální výrobu materiálu k přípravě protislintavkové vakcíny.

Literární údaje

První práce s umělou kultivací viru slintavky, které byly prováděny od roku 1930 (Hecke, Maitland, Borcila, Frenkel, Fogedby aj.) používaly směs embryonální tkáně různého původu. Výsledky těchto prací jsou značně nespojitá a nebylo je možno prakticky využít jak z důvodů poměrně pracných a málo efektivních metodik, tak i vzhledem k nemožnosti pravidelného získávání používaných tkání ve větším měřítku. Rovněž produkováný virus většinou nedosahoval hodnot, nutných pro výrobní materiál.

Až v r. 1946—47 byl problém kultivace viru slintavky převeden na praktický a možno říci průmyslový základ Frenkelem a spol. (4), a to díky jeho originální metodě kultivace viru na přežívající sliznici z hovězích jazyků. Tato metoda se postupně rozšířila do dalších pracovišť, a řada autorů potvrdila vhodnost této metody pro úspěšnou kultivaci viru slintavky (1, 14, 19, 31, 34).

Frenkel využil pro kultivaci viru metodu přežívání fragmentů tkáně v tekutém prostředí a jako tkáň zvolil zvláště citlivou a poměrně lehce dosažitelnou tkáň, tj. sliznici z jazyků dospělého skotu.

Techniku odběru sliznice, způsoby jejího zpracovávání a používání popsal Frenkel v řadě prací (6—10). Další autoři postupně tyto metody doplňovali, z hospodářovali a převedli tuto metodu do provozních měřítek (1, 18, 31, 34).

Největší pozornost při tomto způsobu kultivace byla přirozeně věnována otázkám množení viru a studiu jeho vlastností.

V řadě prací byla sledována dynamika růstových křivek viru slintavky (1, 7, 8, 9, 10, 19, 18, 31). Z jednotlivých údajů možno konstatovat, že infektivita použité sliznice se v kultuře objevuje cca za 3 hodiny po infekci a mezi 6.—8. hodinou inkubace dosahuje již asi stonásobného zvýšení. Maximum infekčního titru je v této kultuře dosaženo mezi 16.—24. hodinou, s průměrem kolem 19 hodiny.

Komplementfixační antigen se objevuje kolem 12. hodiny inkubace, maximum svého titru dosahuje za 24 hodin. Po 60—72 hodinách začíná pozvolna klesat.

Imunizační antigen bývá přítomen od 12. hodiny inkubace. Nejvyššího titru dosahuje rovněž kolem 24 hodin (18—30 hodin). Po 30. hodině poklesává a pak v poměrně širokém časovém rozptýlu mezi 54—72 hodinami opět stoupá, ale nedosahuje již původní úrovně.

Zvláštní pozornost vyvolávala otázka, zda během postupných pasáží nedochází k žádné změně v antigenní struktuře viru, která by mohla mít vliv na použitelnost tohoto viru pro přípravu vakcíny. Mace a spol. (19), Henderson (15) zjistili, že během pasáží nedochází k žádné sérologické změně v antigenní struktuře viru, zvířata po infekci virem z kultury jsou odolná vůči čelení přirozeným virem z aftů skotu a že pokusné vakcíny vyrobené z viru z kultur chránily skot před onemocněním po umělé infekci přirozeným virem. Novější práce (Leunen a spol.) hodnotí však tuto otázku již opatrněji, a to zvláště pokud jde o používání viru z vyšších postupných pasáží (nad 50). Tato otázka je jistě závažná a je předmětem řady dalších prací prováděných v současné době na některých pracovištích (17, 25).

Vlastní práce

Materiál a metody

Virus. K zavedení této metody byl použit výrobní kmen viru slintavky typu A 5, který je v podniku běžně pasážován na vnímavém skotu. Vyznačuje se vysokým titrem infekčního a komplementfixačního antigenu a je výrazně imunogenní.

Jazyková sliznice. Sliznice byla získávána z jazyků zdravých dospělých kusů mladého skotu, který nebyl vakcinován proti slintavce. Jazyky byly odebírány na jatkách bezprostředně po porážce zvířete a byly ihned převezeny do laboratoře ke zpracování. Doba od porážky zvířete do zpracování a uložení sliznice do media nepřesáhla nikdy více než 2 hodiny.

Před odběrem sliznice je nutná důkladná očista jazyka, která v podstatě rozhoduje o sterilitě založené kultury a tím i o celkovém úspěchu kultivace. Očista má 2 fáze:

a) Nesterilní čištění jazyků.

Jazyk se důkladně omyje kartáčem a studenou vodou, pak 0,5% mýdlovým lihem a fosfátovým pufrům (dvakrát).

b) Sterilní čištění jazyků.

Sterilitu povrchu sliznice je dosahováno dvouminutovým drhnutím s 3% čistým lihem, sterilním fyziologickým roztokem a 70% čistým lihem. Nakonec se jazyk ozařuje UV zářičem po dobu 1–2 minut.

Sliznice se odebírá se hřbetu jazyku od valu až ke špičce jednoduše upraveným vysterylizovaným holicím strojkem se sterilní žiletkou. Při odřezávání byly snímány současně vrchní i spodní vrstvy sliznice; zvláště bylo dbáno na to, aby nebyla odřezávána svalovina, která by pak nežádoucně snižovala pH kultury. Odebraná sliznice se ihned vkládala do vychlazeného Tyrodeho roztoku s antibiotiky v poměru 1 díl sliznice na 10 váhových dílů media (prakticky sliznice z 1 jazyku do 200 ml roztoku). Odebraná sliznice se ukládala v lednici při 4° C. Průměrně získáno z jednoho jazyku kolem 20–24 g sliznice.

Sestavení kultury. Vlastní kultivace se prováděla v bankách ze skla Sial nebo Jena, mytých podle zásad pro sklo pro tkáňové kultury. Objem kultury se volil vždy tak, aby nepřesáhl polovinu obsahu nádoby. Při sestavování kultury byl dodržován tento poměr:

- 1 díl jazykové sliznice,
- 1 díl virové suspenze (10–5%),
- 12,5 dílu živného media s antibiotiky.

Ke kultivaci bylo použito syntetického media Frenkelova (modifikovaný Baker) podle Skorina (17). Medium obsahuje 9 aminokyselin, vitamíny, hormony, anorganické soli, peptid, glukózu, pepton; konečné pH je 7,4.

Kultura byla sestavována v tomto pořadí: do kultivační nádoby se odváží příslušné množství sliznice. V malých nasazeních se používaly kusy o velikosti cca 1 cm², ve větších nasazeních se většinou ponechává sliznice v takových kusech, jak byla získána. Ke sliznici se přidá stejné váhové množství 10–5% suspenze viru (filtrát EK). Směs se ponechá při laboratorní teplotě po dobu 10–20 minut a občas se mírně promíchává, aby každý kousek sliznice přišel do styku s virem. Po adsorpční době se přidá 12,5násobné váhové množství me-

dia s antibiotiky. Baňka se pevně uzavře gumovou zátkou se 2 jehlami pro přívod a odvod vzduchu z nádoby (přívodová Jehla dosahuje až ke dnu nádoby). Inkubace kultury se děje při 37° C za stálého míchání na elektromagnetické míchačce. Míchání se upraví tak, aby jednotlivé kusy prudce nevířily, nýbrž stačí jen mírný pohyb media, které proudí kolem sliznice. Kultury se aerují pneumoxydem (95 % kyslíku a 5 % kyslíčnicku uhličitého) v množství cca 1 bublinka plynu za 1 vteřinu na 100 ml media. Sterilita přiváděného plynu je zajištěna jeho průchodem přes vložku Seitz EK. Inkubační doba u dobře adaptovaného kmene je 22–24 hodin. V prvních pasážích při adaptaci je nutno inkubaci prodlužovat až na 42 hodin.

Po ukončení inkubace se získává sliznice, která se skladuje při –40° C, a infekční medium, které lze po omezenou dobu skladovat při 4° C. Pro další pasáž se připravuje suspenze ze sliznice a příslušného media v koncentraci 10–5% a filtruje se přes filtr Seitz EK.

V ý s l e d k y

1. Adaptace viru slintavky na přežívající sliznici a jeho pasážování

Adaptaci viru slintavky na tento typ kultury jsme prováděli podle tohoto schématu:

Primokultura: 100 % viru z aftů,

1. pasáž: 66 % viru z aftů + 33 % viru z primokultury,
2. pasáž: 50 % viru z aftů + 50 % viru z 1. pasáže,
3. pasáž: 33 % viru z aftů + 66 % viru z 2. pasáže,
4. pasáž: 100 % viru z 3. pasáže.

V linii I byla adaptace prováděna podle tohoto schématu v tomto objemu: 8 g sliznice, 8 ml 10 % suspenze viru a 100 ml živného media s antibiotiky.

Materiál z každé pasáže byl vyhodnocován na přítomnost viru sérologicky a biologicky.

Přítomnost komplementfixačního antigenu byla sledována ve sliznici a v mediu. Ve sliznici se projevila výrazně pozitivní reakce ve 2. pasáži, pak v 5., 7., 9. a v 10. pasáži. Medium bylo sérologicky pozitivní prakticky v každé pasáži. Jednotlivé hodnoty jsou uvedeny v tabulce I a v grafu 1.

Průkaz viru v jednotlivých pasážích byl prováděn dále biologickými testy na morčatech, na skotu a na sajících myškách.

Primokultura a 1. pasáž byla při *i. d.* aplikaci do patek morčatům negativní. 2. pasáž vyvolala již pozitivní lokální reakci na morčecích patkách a rovněž sérum těchto zvířat vykazovalo za 14 dní *p. i.* přítomnost komplementfixačních protilátek. Podobný a ještě výraznější výsledek dala 3. pasáž.

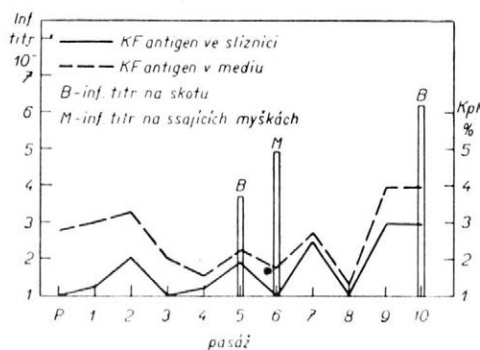
5. pasáž byla titrována na skotu (podle Hendersona v modifikaci Barkově) s výsledkem $10^{-3,76}$ (ID_{50} v 0,5 ml propočteno podle Reeda a Muencha). 6. pasáž byla titrována na sajících myškách (Skinner), kde byl prokázán titr $10^{-5,0}$ (LD_{50} v 0,03 ml). 10. pasáž byla titrována opět na skotu s výsledkem $10^{-6,39}$.

Uvedené výsledky jsou znázorněny v grafu č. 1.

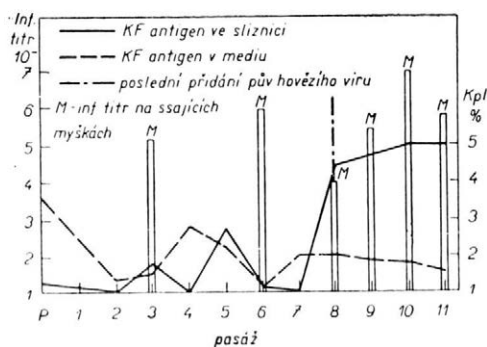
I. Hodnoty komplementfixačního antigenu ve sliznici a v mediu v prvních 10 pasážích adaptace viru slintavky

Pasáž	A — sérum				Kontroly			
	Kpl 2%	3%	4%	5%	2%	3%	4%	5%
Sliznice:								
Primo	+	H	H	H	+	H	H	H
1. pasáž	+	H	H	H	H	H	H	H
2. pasáž	++++	H	H	H	H	H	H	H
3. pasáž	+	H	H	H	+	H	H	H
4. pasáž	+	H	H	H	H	H	H	H
5. pasáž	++++	+	H	H	H	H	H	H
6. pasáž	+	H	H	H	++	H	H	H
7. pasáž	++++	++	+	H	+	H	H	H
8. pasáž	H	H	H	H	H	H	H	H
9. pasáž	++++	++++	+	H	++++	H	H	H
10. pasáž	++++	++++	H	H	++	+	H	H
Medium:								
Primo	++++	+	H	H	H	H	H	H
1. pasáž	++++	++++	H	H	H	H	H	H
2. pasáž	++++	++++	+	+	H	H	H	H
3. pasáž	++++	+	+	H	+	H	H	H
4. pasáž	++	+	H	H	H	H	H	H
5. pasáž	++++	+	H	H	H	H	H	H
6. pasáž	++	+	H	H	H	H	H	H
7. pasáž	++++	+++	H	H	H	H	H	H
8. pasáž	+	H	H	H	+	H	H	H
9. pasáž	++++	++++	++++	+	H	H	H	H
10. pasáž	++++	++++	++++	H	H	H	H	H

+ — ++++ stupeň útlumu hemolýzy, H — hemolýza.



Graf 1.



Graf 2.

Další postupné pasáže viru slintavky byly prováděny stále stejným způsobem, tj. každá následující pasáž byla infikována 10% suspenzí sliznice v mediu z předešlé pasáže. Hodnoty získaného materiálu byly ověřovány sérologicky a biologickými testy na skotu a sajících myškách. S touto linií se podařilo provést 70 přímých pasáží, při čemž si virus zachovával všechny své vlastnosti sérologické, infekční a — jak ukázaly i pokusné vakcíny — i imunizační.

K ověření reprodukovatelnosti tohoto způsobu adaptace byly provedeny ještě další shodné adaptační pokusy. Ze 4 linií byla pozitivní pouze jedna. Ve třech případech se virus nepodařilo udržet více než po 3 počáteční pasáže.

V dalších pokusech jsme proto upravili adaptační schéma tím, že jsme prodloužili přidávání aftózního viru ještě do dalších postupných pasáží. Od 4. postupné pasáže jsme k plně dávce viru z předešlé pasáže přidávali ještě 50% dávku viru z aftů (8 g sliznice, 8 ml virové suspenze z předešlé pasáže a 4 ml suspenze původního viru z hovězích aftů). Tímto způsobem jsme se pokusili adaptovat virus v dalších 5 liniích. Aftózní virus byl přidáván do 8., 10. a 16. pasáže. Pozitivní výsledky byly získány ve 4 případech. Postup adaptace v linii, kde byl původní štok-virus přidáván do 8. postupné pasáže, ukazuje graf 2.

V jednom případě, kdy byl štok-virus přidáván až do 16. postupné pasáže, se virus množil velmi slabě a bez přidávání původního viru jej nebylo možno dále pasážovat.

Vlastní pasážování dobře adaptovaných kmenů dává celkem standartní výsledky. Infekční titer se v jednotlivých liniích pohyboval mezi $10^{-3,1}$ až $10^{-7,0}$ při titracích na skotu, a mezi $10^{-5,0}$ až $10^{-8,0}$ při titraci na sajících myškách.

V řadě jednotlivých pasáží jsme však při zcela stejných podmínkách kultivace měli často značné rozdíly v dosažených výsledcích a nechyběly ani zcela negativní pasáže. V opakovaných pokusech se ukázalo, že prakticky není možné dosáhnout zcela shodných výsledků.

Vzhledem k tomu, že při těchto pracích byly zachovávány všechny postupy a materiály stejné a měnila se jediné používaná sliznice, lze se domnívat, že samotná sliznice představuje v této metodě poměrně variabilní faktor, který ovlivňuje vlastní pomnožování viru. Tato skutečnost má své důsledky při praktickém využívání této metody.

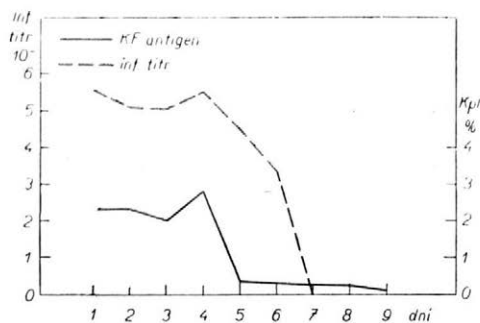
2. Délka použitelnosti odebrané sliznice

Jakmile jsme získali pozitivní výsledky kultivace, bylo nutno orientačně ověřit otázku, jak dlouho po odběru je sliznice ještě použitelná pro kultivaci viru slintavky.

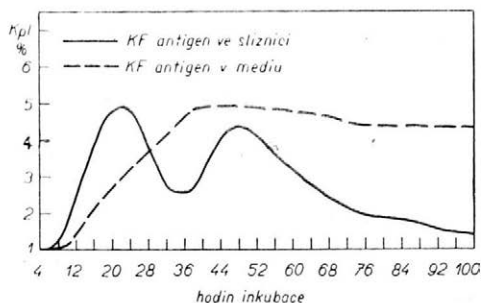
Pro tento účel byla připravena suspenze viru z dobře adaptovaného kmene (49. pasáž), přefiltrovaná přes filtr Seitz EK, rozplněna po 17 ml do zkumavek a uložena při -40°C . Dále bylo odebráno příslušné množství sliznice z více jazyků, sliznice byla rovnoměrně promíchána a uložena v Tyrodeho roztoku při teplotě 4°C .

V následujících 9 dnech byly z této sliznice pravidelně nasazovány kultury stejného objemu se stejným štok-virem a stejnou šarží živního media. Každá nasazená kultura byla inkubována po dobu 24 hodin. V jednotlivých kulturách, které se lišily jen různě starou sliznicí, byl pak vyhodnocován výsledek pomnožení viru, a to na základě zjišťování výše titru viru na skotu a obsahu komplementfixačního antigenu. Sliznice, která byla uskladněna 1–4 dny, umožňuje celkem stálé a vyrovnané výsledky. Od 4. dne dochází k poměrně prudkému poklesu v množení viru. Sliznice, která byla uložena v ledničce 5 dní, dává již

jen nepatrný vzrůst komplementizačního antigenu. Výše vytvořeného infekčního titru klesá souvisle a poměrně prudce od 4 do 7 denní sliznice. Po této době je sliznice již zcela nevhodná k použití (výsledky jsou uvedeny v grafu 3).



Graf 3.



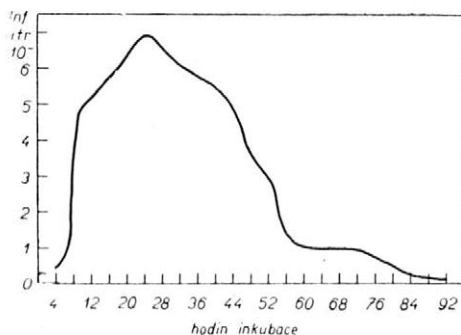
Graf 4.

3. Růstové křivky viru

Jedním z důležitých otázek při zavádění této metody do praxe byla otázka dynamiky množení viru slintavky v tomto typu kultury. Abychom si ověřili stávající údaje byly založeny větší kultury adaptovaného kmene, ze kterých byly v pravidelných časových intervalech za aseptických podmínek odebírány vzorky sliznice a media k ověřování obsahu viru. Infekční titr byl zjišťován na sajících myškách a též na tkáňových kulturách z hovězích epiteliálních buněk. Obsah komplementfixačního antigenu byl zjišťován ve sliznici a v mediu sérologicky. Dynamika množení byla sledována od 4 do 122 hodin po infekci. Výsledky byly vyhodnoceny z 10 nasazení.

Komplementfixační antigen (graf 4) se objevuje ve sliznici kolem 10. hodiny inkubace kultury. Pak poměrně prudce stoupá ke svému nejvyššímu bodu, který je obvykle mezi 20.—24. hodinou. Po této době dochází pravidelně ke značnému poklesu a mezi 40.—50. hodinou, v některých případech až mezi 70. až 90. hodinou k novému vzestupu, který však již obvykle nedosahuje výše prvního maxima. Od 70. hodiny titr komplementfixačního antigenu ve sliznici klesá, nedochází však k úplnému vymizení a udržuje se na prokazatelné hodnotě nejméně po 100 hodin inkubace.

V živném mediu se komplementfixační antigen objevuje obvykle asi o 4 hodiny později než ve sliznici. Rovněž tak vrcholu titru bývá v mediu dosaženo později než ve sliznici, a to někdy až o 20 hodin, v průměru kolem 15 hodin. V mediu nepozorujeme tak nápadný pokles titru, jako je tomu u sliznice. V době mezi 40.—50. hodinou inkubace kultury dochází k převaze výše obsahu antigenu v mediu nad sliznicí a toto se udržuje až do 12 hodin. Většinou se v mediu setkáváme s poměrně vyrovnanou hladinou komplementfixačního antigenu po celou dobu kultivace s celkem bezvýznamnými individuálními výchyly.



Graf 5.

Infekční titr (graf 5) narůstá v kultuře od 4. do 8. hodiny po infekci. Jeho množství stoupá velmi strmě k maximálním hodnotám, které se objevují již kolem 16. hodiny *p. i.* Infekční titr kultury zůstává v maximu obvykle až do 22–24 hodin *p. i.* Po této době nejprve pomalu klesá do 40 hodin, pak se projevuje strmý pokles až do 52–54 hodin. Na poměrně nízké úrovni zůstává infekční titr prokazatelný nejméně do 90 hodin *p. i.* Ojedinele jsme zjistili, že infekční titr zůstává na vysoké hodnotě poměrně velmi dlouhou dobu (až do 42 hodin).

4. Imunogenní vlastnosti kultivovaného viru

Abychom si ověřili vhodnost produkovaného viru pro imunizační účely, byly připraveny pokusné vakcíny, které pak byly titrovány na účinnost na vnímavém skotu. Bylo připraveno a ověřeno celkem 11 operačních čísel pokusných vakcín. Při jejich přípravě byla zachovávána metodika přípravy obchodní 2% vakcíny — adsorbátové vakcíny, inaktivované formalinem při teplotě 25° C po dobu 24 hodin.

Byly připraveny jednak vakcíny monovalentní 2% (9 op. č.), 1% (1 op. č.), 3% (1 op. č.) a dále vakcína bivalentní (1 op. č.). Vyhodnocování těchto vakcín bylo prováděno jednak pomocí metody stanovení 50% protekční dávky pro skot (Henderson, Galloway), dále metodou protekčních testů a metodou určení stupně protekce titrační metodikou na jazycích vakcinovaného skotu (obě metody jsou v ČSN pro protislintavkovou vakcínu). Imunní stav byl zjišťován v krátkodobých pokusech za 14–21 dní po vakcinaci. Výsledky s vakcínami, připravenými pouze z viru kultivovaného *in vitro*:

a) Stanovení účinnosti pomocí určení PD₅₀

- Op. č. I (2%): PD₅₀ menší než 5 ml (určeno na 2 kusech skotu),
- Op. č. II (2%): PD₅₀ 7,4 ml (určeno na 12 kusech skotu),
- Op. č. III (2%): PD₅₀ menší než 3 ml (určeno na 20 ks skotu),
- Op. č. V (2%): PD₅₀ 9,7 ml (určeno na 20 ks skotu),
- Op. č. III (1%): PD₅₀ 9,0 ml (určeno na 9 ks skotu),
- Op. č. VIII (3%): PD₅₀ 4,6 ml (určeno na 9 ks skotu).

b) Stanovení účinnosti pomocí protekčního testu:

- Op. č. I (2%): vyhovující ochrana 83 % zvířat (použito 6 ks skotu),
- Op. č. II (2%): vyhovující ochrana 83 % zvířat (použito 6 ks skotu),
- Op. č. III (2%): vyhovující ochrana 88 % zvířat (použito 24 ks),
- Op. č. V (2%): vyhovující ochrana 76,5 % zvířat (použito 17 ks).

c) Stanovení účinnosti metodou určení stupně protekce:

- Op. č. VII (2%): dosažená hodnota vakcíny: ±1,63,
- Op. č. VIII (2%): dosažená hodnota vakcíny: ±2,1,
- Op. č. XII (2%): dosažená hodnota vakcíny: ±0,85.

Na základě těchto výsledků byla připravena pokusná vakcína typu A, kde 50 % virového materiálu bylo z kultury *in vitro* a 50 % z přirozeného viru z hovězích aftů. Stanovení 50% protekční dávky této vakcíny dalo příznivý výsledek v hodnotě menší než 3 ml. (určeno na 20 ks skotu).

V souladu se všemi dosaženými výsledky byla připravena bivalentní vakcína, kde 50 % typu A bylo zastoupeno materiálem z kultivace na přežívajících sliznicích a 50 % z přirozeného hovězího viru. Typ 0 byl v plném rozsahu za-

stoupen materiálem z hovězích aftů. Tato vakcína vyhověla v testech neškodnosti a účinnosti podle požadavků státní kontroly biopreparátů, takže bylo možno s touto vakcínou provést větší terénní pokus na 25 000 zvířatech ve 2 krajích ČSSR. Dosavadní výsledky sledování těchto zvířat ukázaly, že za 5 měsíců po vakcinaci je možno u namátkou vybraných zvířat zjistit 100 % imunitu, za 6 a 7 měsíců po vakcinaci je postačující imunita u 90 % zvířat. (Všechny uvedené výsledky jsou podrobně zpracovány v samostatné práci autora a spol.).

Zhodnocení výsledků a diskuse

Na základě dosažených výsledků je možno konstatovat, že kultivace viru slin-tavky na přežívajících sliznicích z hovězích jazyků v popsané metodice dala pozitivní a reprodukovatelné výsledky a že tento způsob lze použít pro rutinní kultivaci viru slin-tavky.

Tato metoda využívá přirozeně velmi citlivé tkáně z jazyků skotu, která je poměrně lehce dosažitelná a její odběr nečiní pro zapracované pracovníky v příměřeníném zařízení potíží. Rovněž tak vlastní kultivace v rámci prací s tkáňovými kulturami nevyžaduje větších technických nároků a při zachování zásadních pravidel práce tohoto druhu dává stabilní výsledky.

Závažný požadavek sterility kultivace při používání tkáně, která je v důsledku svého původu povrchově masivně kontaminovaná a znečištěná, lze splnit pečlivým postupem při mytí a odběru sliznice, přísně aseptickou prací při zakládání kultur a soustavným používáním antibiotik do všech roztoků a medií.

Při kultivaci jsme používali zásadně celou sliznici bez rozlišování vrchních a spodních vrstev, která byla stříhána jen na nejnutnější míru podle objemu kultury. Kladné výsledky potvrzují, že původně doporučované manipulace se stříháním nebo řezáním sliznice (4, 6) nebyly účelné a že podstatně naopak narušovaly životnost tkáně.

Předpokladem úspěchu této metody je získání sliznice v co nejčerstvějším stavu. Všeobecně se požaduje, aby sliznice byla stažena z jazyku do 2 hodin po poražení zvířete, což se v našich pracích zásadně dodržuje. Mace a spol. (19) uvádějí použitelnost odebrané sliznice, uložené v Tyrodeho roztoku při 40 °C, po dobu 5 dní. Celkem v soulasu s tímto údajem byly naše výsledky, které ukázaly, že 4. den po odběru je sliznice ještě plněhodnotná. S ohledem na skutečnost, že přežívání sliznice je závislé na více činitelích, které nejsou přesně známy, byla zavedena praxe, že sliznice se skladuje před použitím maximálně 48 hodin.

Živné medium, které se používá ke kultivaci, je poměrně složité, náročné na úzkoprofilové chemikálie a jeho příprava je náročná na přesnost a sterilitu. Bylo provedeno více pokusů s různými modifikacemi a jednoduššími roztoky (Henderson, Mace aj.). I v našich podmínkách se sledují možnosti náhrady některých aminokyselin a byly již získány slibné výsledky v dílčích úsecích (Petr, Horníček).

Pasážování viru na tomto typu kultury vyžaduje předchozí adaptaci. V našich pokusech jsme dosáhli tohoto cíle pomocí postupného přidávání původní virové suspenze k pasážím. Původně jsme použili klesajících dávek do 3. pasáže, což se však ve všech případech neukázalo postačující. Tato zkušenost byla potvrzena i sovětskými pracovníky. Delší přidávání, až do 8.—10. pasáže, zvyšuje % kladných adaptací.

Při adaptačních pracích se ukázalo, že v počátečních pasážích, kdy virus ještě není dostatečně adaptován na tento typ kultury, převládá většinou titr komplement-

fixačního antigenu v mediu nad titrem ve sliznici. Po více než 10. pasážích se tento poměr obvykle obrací ve prospěch sliznice. Snad by bylo možno vzít tento znak v úvahu jako ukazatel zdařilé adaptace. Toto posuzování je však třeba provádět velmi opatrně, a to zvl. s ohledem ke skutečnosti, že při prodloužení délky inkubace kultury nad 40 hodin titr KF antigenu ve sliznici klesá, zatím co v mediu ještě stoupá a udržuje se mnohem déle na vysokém titru než ve sliznici.

Pokud hodnotíme postupné pasážování již adaptovaného kmene viru, je třeba upozornit na uvedené variace ve vytvářených hodnotách viru při zachování všech podmínek kultivace. Rozdílnost výsledků bude pravděpodobně spočívat v samotné použité sliznici, ve stupni přežívání tkáně. S počtem životaschopných buněk v použité tkáni bude přímo souviset i množství vyprodukovaného viru. Hirtz a Fayeri (16) uvádí na základě biochemických studií, že přežívání buněk hovězího jazykového epithelu je velmi slabé.

Tato skutečnost má ovšem své důsledky pro praktické použití této metody, zvláště v provozním rozsahu, kde je nutno počítat s produkcí méně vhodného i nevyhovujícího materiálu i při zachování všech pravidel této kultivace. Nevytváří se tak zcela ideální situace, která by ukazovala, že tímto způsobem lze s konečnou platností vyřešit problém získávání viru pro výrobu vakciny.

Velmi závažná otázka dynamiky množení viru v tomto typu kultury byla řešena sledováním růstových křivek infekčního a komplementfixačního antigenu. Získané výsledky celkem velmi dobře souhlasí se stávajícími literárními údaji. Na rozdíl od Ubertiniho jsme však ve 2 případech zjistili druhý vzestup infekitivity kultury, a to v době 38–48 hodin po infekci. Dynamika tvorby viru v tomto typu kultury odpovídá celkem dynamice množení viru v živém skotu a rovněž tak hodnoty viru z kultury i ze živého organismu jsou co do titru infekčního a komplementfixačního antigenu velmi blízké. Při pasážování viru až do 50. pasáže jsme nezaznamenali žádné změny ve vlastnostech pasážovaného viru.

Zvláštní pozornost byla věnována otázce imunogenních schopností pasážovaného viru. Z dosažených výsledků vyplynulo, že tento virus si udržuje nejméně do 50. postupné pasáže své imunizační vlastnosti a že při aplikaci ve formě inaktivované vakciny vyvolává imunní reakce u vakcinovaného skotu. Rozbor těchto výsledků je předmětem samostatné práce.

Vzhledem k tomu, že nebyly dosud ukončeny práce s dlouhodobým sledováním vývoje imunního stavu po vakcinaci takto vyrobenými vakcinami a vzhledem k velmi přísným hlediskům naší kontroly vakciny proti slintavce, se jevílo jako použitelné řešení prozatím částečné přidávání viru kultivovaného *in vitro* k viru přirozenému. 50% náhrada viru typu A materiálem z kultur se ukázala jako velmi účinná a ekonomicky efektivní. Takto vyrobená vakcína si udržela své původní velmi dobré vlastnosti jak v síle, tak i v délce vytvořené imunity.

Souhrn

1. Byla popsána metodika kultivace viru slintavky na přežívajících sliznicích z hovězích jazyků.

Adaptace viru slintavky na tento typ kultury byla provedena postupným přidáváním původního přirozeného viru až do 3., resp. 8.–10. pasáže.

2. Byly ověřeny růstové křivky viru slintavky v tomto typu kultury.

3. Imunizační hodnota pasážovaného viru byla prokázána pomocí pokusných vakcín, vyhodnocovaných na vnímavém skotu.

Došlo dne 20. 6. 1962

Literatura

1. Fogedby, Johnson: Bull. OIE, 1952, 37, 473-486. — 2. Frenkel: Arch. f. Tierhkl. 1938, 30, 265-270. — 3. Frenkel: Bull. OIE, 1937, 14, 209-222. — 4. Frenkel: Bull. OIE, 1947, 28, 155-162. — 5. Frenkel: Nature, 1949, 235-236. — 6. Frenkel: Am. J. Vet. Res. 1950, 11, 371-370. — 7. Frenkel: Am. J. Vet. Res. 1951, 12, 187-190. — 8. Frenkel: Am. J. Vet. Res. 1952, 13, 21-23. — 9. Frenkel: Am. J. Vet. Res. 1954, 15, 346-348. — 10. Frenkel: Am. J. Vet. Res. 1956, 17, 40-44. — 11. Hecke: Zblt. f. Bakt. I. Orig. 1930, 116, 386-414. — 12. Hecke: Zblt. f. Bakt. I. Orig. 1931, 119, 385-397. — 13. Hecke: Zblt. f. Bakt. Orig. 1932, 126, 93-101. — 14. Henderson: Proc. Xth Int. Vet. Congr. Stockholm, 1953, I, 191-195. — 15. Henderson, Galloway: J. Hyg. Camb. 1953, 51, 546-558. — 16. Hirtz, Fayet: Rev. Immunol. 1955, 19, 436-446. — 17. Hubík: Cestovní zpráva - SSSR, 1958. — 18. Leunen: Arch. f. Exp. Vet. Med. 1961, XV, 224-228. — 19. Mace a spol.: J. Inf. Dis. 1951, 88, 212-223. — 20. Mackowiak a spol.: Rev. Immunol. 1955, 19, 426-435. — 21. Maitland, Maitland: J. Comp. Path. a. Ther. 1931, 44, 106-113. — 22. Nardelli: BMTW, 1956, 69, 309-311. — 23. Petermann: Zblt. f. Bakt. Orig. 1959, 175, 63-71. — 24. Petermann, Mackowiak: Symp. Int. Vir. Lyon, 1958. — 25. Polák a spol.: Cestovní zpráva - Francie, 1960. — 26. Polák, Král: Cestovní zpráva - Francie, 1962. — 27. Pilz: Arch. f. Exp. Vet. Med. 1961, XV, 282-285. — 28. Röhrer: Handbuch der Virusforsch. 1958. — 29. Salomon: Encycl. Vet. 1953, 44-56. — 30. Skinner: Proc. Roy. Soc. Med. 1951, 44, 1041. — 31. Ubertini a spol.: Zblt. f. Vet. Med. 1953, 3, 418-453. — 32. Ubertini a spol.: Zblt. f. Vet. Med. 1956, 3, 767-787. — 33. Ubertini a spol.: Vet. Ital. 1955, 6, 403-410. — 34. Willems, Leunen: Bull. OIE. 1956, 45, 298-308.

Культивирование вируса ящура на переживающих слизистых оболочках языка крупного рогатого скота по методу Френкеля

1. Описывается методика культивирования вируса ящура на переживающих слизистых оболочках языка крупного рогатого скота. Адаптирование вируса ящура на этот тип культуры было произведено путем постепенного добавления первоначального естественного вируса вплоть до 3, а при случае 8—10 пассажах.

2. Были проверены кривые роста вируса ящура в этом типе культуры.

3. Иммунизационное качество пассажированного вируса было доказано при помощи опытных вакцин, оцениваемых на восприимчивых животных.

Die Kultivation des Virus der Maul- und Klauenseuche auf überlebenden Schleimhäuten von Rinderzungen nach der Methode von Frenkel

1. In der Arbeit wurde die Methode der Kultivierung des Virus der Maul- und Klauenseuche auf frisch abgenommenen Schleimhäuten aus Rinderzungen beschrieben. Das Virus der Maul- und Klauenseuche wurde auf diese Art der Kultivierung

durch die stufenweise Zugabe des ursprünglichen natürlichen Virus bis zu der dritten resp. 8—10 Passage adaptiert.

2. Es wurden die Wachstumskurven des Virus auf diesem Typus der Kultur beglaubigt.

3. Der Immunisationswert des passagierten Virus wurde mit der Hilfe der Versuchsvakzinen auf den empfindlichen Rindern beglaubigt.

Sdružená vakcinace bivalentní vakcínou proti moru a července prasat

Объединенная вакцинация двухвалентной вакциной против чумы и рожи свиней

**Die gleichzeitige Vakzinierung mit bivalenter Vakzine gegen Schweinerotlauf
und Schweinepest**

MVDr. Leopold ROSSI

VÚVL Brno

Pracováno v Biovetách n. p. Ivanovice na Hané a Nitra

Úvod

V roce 1961 bylo referováno (Rossi) o kombinovaném a sdruženém očkování proti července a Kloboukové nemoci (nakažlivé obrně vepřů) a o kombinovaném očkování adsorbátovou vakcínou proti července vepřů a krystalvioletovou vakcínou proti moru vepřů.

Po uspokojivých výsledcích experimentálního prověření uvedených způsobů očkování bylo také se souhlasem ministerstva zemědělství přikročeno k experimentálnímu prověření bivalentní očkovací látky proti moru a července prasat.

Praktická veterinární služba by zejména po vědecké diskusi o moru prasat v Luhačovicích 1959 uvítala sdružené očkování proti oběma nákazám bivalentní vakcínou ještě více než proti července a Kloboukové nemoci. Sdružená imunoprophylaxe proti července a moru prasat by ještě více zvýšila efektivnost hromadných veterinárních úkonů.

Literatura

Otázkou sdružené vakcinace proti moru a července prasat se zabývali Geiger a Poppe. Během pokusů s krystalvioletovou vakcínou proti moru prasat vyrobili bivalentní vakcínu proti moru a července prasat a zkoušeli očkovací látku na jejich účinnost. Při posuzování účinnosti bivalentní vakcíny znovu zjišťili otázku — konkurence antigenů. Připustili však, že jejich pokusy byly prováděny na příliš malém počtu zvířat, než aby z nich mohl být učiněn závěr.

Kolesov (1961) zdůrazňuje, že prudký rozvoj živočišné výroby vyžaduje od veterinárních lékařů zvýšené úsilí při provádění profylaktických zákroků. Doporučuje na základě příznivých výsledků pokusné simultánní imunizace (Glotov 1959) proti sněti slezinné a sněti šelestivé její uzákonění. Autor dále podotýká, že jsou veterinární ústavy povinny prostudovat otázky simultánní vakcinace proti moru a července prasat, proti moru a neštovicím drůbeže, slintavce, sněti šelestivé aj.

Lysenko a Cymbal (1961) doporučují vypracovat účinné imunizační metody proti několika infekcím současně buď pomocí monovakcín, užívaných v praxi,

nebo pomocí speciálně vyrobených sdružených vakcín. Autoři studovali imunitu po vakcinaci sdruženou vakcínou proti slintavce a moru prasat a došli k závěru, že rozhodující význam pro složení účinné sdružené vakcíny má kvantitativní poměr a druh antigenů použitých při výrobě očkovací látky. Při zjištěném poměru směsi vakcín proti moru a slintavce bylo možno vyrobit sdruženou vakcínu, která poskytuje vyhovující imunitu proti oběma infekcím.

Při studiu sdružené vakcinace bylo zjištěno, že vakcína proti Aujezského chorobě inhibuje tvorbu protimorové imunity, je-li spojena s protimorovou vakcínou, a zřejmě inhibuje tvorbu imunity proti slintavce a července prasat, je-li smísená s vakcínou proti uvedeným nemocem.

Použití vakcín z homologních tkání zvyšuje podle autorů reaktivnost organismu a tím zamezuje, aby se projevila konkurence antigenů.

Metodika práce

K zjištění možnosti imunizace sdruženou očkovací látkou proti moru a července prasat byla předně vyrobena:

A. Sdružená bivalentní vakcína proti moru a července vepřů z krystalvioletové vakcíny a adsorbátové vakcíny proti července vepřů *ana partes*.

Po negativním opakovaném bakteriologickém vyšetření byla očkovací látka injikována prasatům podkožně v krajině předkolenní řasy v dávce 5 a 6 ml.

Zkouška imunity na červenku vepřů byla podle Fortnera a Dintera provedena za 21–25 dní po vakcinaci a zkouška účinnosti na mor vepřů podle titračního předpisu pro krystalvioletovou vakcínu proti moru prasat za 31, 38 resp. 48 dní při opakovaném očkování.

B. Sdružená vakcína z krystalvioletové vakcíny proti moru vepřů a adsorbátové vakcíny proti července prasat bez formalínu *ana partes*.

C. Sdružená vakcína z krystalvioletové vakcíny a adsorbátové vakcíny proti července prasat bez formalínu v poměru 3:2.

U obou posledních očkovacích látek byla po důkladné homogenizaci zjišťována devitalizace b. červenky prasat ve směsi po dobu 1 měsíce a teprve po negativním opakovaném bakteriologickém vyšetření byla vakcína ještě injikována bílým myšákům v dávce 0,5 ml v krajině hřbetní a po důkazu neškodnosti byla aplikována 15 prasatům rovněž v krajině předkolenní řady podkožně v dávce 6 ml. V době 3 týdnů trvající zkoušky neškodnosti byla zvířatům denně měřena teplota a celkový zdravotní stav byl rovněž sledován.

Při zkoušce účinnosti na červenku vepřů byla infekce vakcinovaných a kontrolních vepřů provedena též podle Fortnera a Dintera 3 kmeny b. červenky.

Za týden po infekci červenkou vepřů byl prasatům injikován virus moru vepřů v dávce 1 ml podkožně.

Také zkouška účinnosti na mor vepřů byla sledována 3 týdny.

U všech pokusných, poražených nebo uhynulých prasat byly zjišťovány pato-logicko-anatomické nálezy. Je samozřejmé, že u každého pokusu byl sledován průběh červenky a moru prasat u neočkovaných kontrolních zvířat.

Vlastní práce

A) Bivalentní vakcína proti července a moru prasat vyrobená z krystalvioletové vakcíny proti moru vepřů a z formolované adsorbátové vakcíny proti července prasat byla ve dvou pokusech 19 prasatům váhy 20–35 kg injikována podkožně v dávce 5 ml a ve dvou dalších pokusech v dávce 6 ml.

Ve třech pokusech byla provedena pouze jednorázová vakcinace, kdežto ve 4. pokuse byla provedena revakcinace pouze krystalvioletovou vakcínou za 36 dní po první vakcinaci.

I. Zkouška účinnosti na červenu prasat po vakcinaci bivalentní vakcinou proti července a moru prasat

Pokus číslo	Počet vepřů	Váha	Dávka bivalentní vakcíny	Vakcinace	Revakcinace	Zkouška imunity na č. v.		
						za dní	bez příz.	č. v.
1	10	20–35	5	/	—	21	10	—
2	9	20–35	5	/		22	9	—
3	8	20–35	6	/		22	8	—
4	10	20–35	6	/	za 36 d. po vakc.	25 po vakc.	10	—
Kontroly	20 (á 5)					Infekce vždy s očk. pras.		++++ výrazné příz.č.v.

Z tabulky I vyplývá, že prasata vakcinovaná bivalentní sdruženou vakcinou proti července a moru prasat (A) neonemocněla červenkou prasat po mohutné infekci červenkovými bujónovými kulturami za 21–25 dní po vakcinaci. U všech očkovaných prasat byla plně vyvinuta imunita proti července prasat. U všech kontrolních prasat byly zjištěny typické příznaky červenkového onemocnění (lokální i všeobecné).

Z výsledků zkoušky imunity na mor prasat uvedených v tabulce II vyplývá, že jednorázově očkovaná prasata sdruženou vakcinou proti moru a července prasat (A) — pokus č. 1–3, onemocněla všechna po infekci 1 ml viru moru vepřů příznaky moru vepřů a uhynula resp. byla poražena téměř sou-

II. Zkouška účinnosti na mor prasat po očkování bivalentní sdruženou vakcinou proti července a moru prasat (A)

Pokus číslo	Počet vepřů	Váha	Dávka bivalentní vakcíny	Vakcinace	Revakcinace	Zkouška imunity na mor vepřů m. v.		
						za dní	bez příz.	m. v.
1	10	20–35	5	/	—	31	—	10
2	9	20–35	5	/	—	38	—	9
3	8	20–35	6	/	—	22	—	8
4	10	20–35	6	/	36 dní kr.v.v.	48 (12)	9	1
Kontroly	20					20		

časně s kontrolními zvířaty. Patologicko-anatomicky byly u prasat kromě příznaků moru vepřů zjištěny chronické bronchopneumonické změny a bakteriologicky byla vykultivována *salmonella cholerae suis*. Obdobný nález byl konstatován u kontrolních prasat.

Ve čtvrtém (4) pokuse bylo 10 vepřů revakcinováno za 36 dní po prvním očkování sdruženou (bivalentní) vakcínou proti moru a července prasat pouze krystalvioleťovou vakcínou v dávce 3 ml podkožně.

Za 48 dní po vakcinaci a za 12 dní po druhém očkování byla provedena infekce 1 ml viru moru vepřů.

U této skupiny prasat onemocněl a také uhynul pouze jediný. Patologicko-anatomicky byla zjištěna rozsáhlá bronchopneumonie a příznaky moru prasat. Bakteriologické vyšetření orgánů bylo negativní.

Srovnávací pokus prokázal dobré imunizační vlastnosti monovalentní krystalvioleťové vakcíny proti moru prasat a neuspokojující imunizační účinnost sdružené (bivalentní) očkovací látky proti moru a července prasat.

Po negativním výsledku imunizace sdruženou vakcínou (A) proti moru a července prasat byla vyrobena druhá sdružená vakcína proti moru a července prasat z krystalvioleťové vakcíny proti moru a neformalinové adsorbátové vakcíny proti července vepřů *ana partes*.

Sterilita vakcíny zjištěná až 26. den byla na neškodnost přezkoušena ještě v dávce 0,5 ml na 10 bílých myškách. Po průkazu neškodnosti byla očkovací látka injikována v dávce à 6 ml podkožně ve dvou pokusech 15 vepřům.

III. Zkouška účinnosti na červenu vepřů po vakcinaci sdruženou vakcínou proti moru a července prasat (B)

Pokus číslo	Počet vepřů	Váha	Dávka bivalentní vakcíny	Vakcinace	Revakcinace	Zkouška imunity na č. v.		
						za dní	bez příz.	č. v.
1	8	30	6 3 + 3	/	—	22	8	—
2	7	30	6 3 + 3	/	—	21	7	—
Kontr.	4	30	—	—	—			++++

V tabulce III uvedené 2 pokusy dokazují kladnou imunizační účinnost sdružené vakcíny proti července a moru prasat bez formalínu proti července prasat.

U vakcinovaných prasat nebylo zjištěno onemocnění červenkou a u kontrolních prasat došlo k typickým příznakům onemocnění.

Při zkoušce imunity na mor vepřů mohla být zjištěna pouze negativní účinnost vakcinace po infekci provedené za 38 dní po vakcinaci.

U uhynulých, resp. nutně poražených prasat byly kromě příznaků moru vepřů patologicko-anatomicky sledovány ještě rozsáhlé změny katarální bronchopneumonie (chřipky prasat).

Po nepříznivém výsledku obou sdružených vakcín (A, B) při zkoušce účinnosti na mor prasat byla vyrobena ještě 3. sdružená vakcína z 3 dílů krystal-

IV. Zkouška immunity na červenu a mor prasat po vakcinaci sdruženou vakcinou proti července a moru prasat (C)

Pokus číslo	Počet prasat	Váha	Dávka bivalentní vakcíny	Vakcinace	Zkouška imunity na					
					červenu			mor		
					za dní	b. p.	č. v.	za dní	b. p.	m. v.
1 labor.	15	30–35	8	/	20	15	—	28	10	5
2 praxe	10				82	1	9+	97	—	10
Kontr.	8	onemocnělo zjevně výraznými příznaky červeny prasat, resp. moru prasat.								

*) viz legenda.

violetové vakcíny a 2 dílů neformalinované odsorbátové vakcíny proti července vepřů.

Sdružená vakcína byla po přechovávání při teplotě 4–6° C shledána sterilní až za 30 dní. Pokus na myškách potvrdil její neškodnost, a proto byla očkovací látka injikována 15 prasatům váhy asi 35 kg v dávce 8 ml podkožně.

První pokus uvedený v tabulce IV prokazuje plnou imunizační účinnost proti července prasat, neboť při zkoušce účinnosti nebylo zjištěno červenkové onemocnění. Při zkoušce imunizační účinnosti proti moru vepřů mohl být zjištěn v 66 % příznivý výsledek proti moru vepřů, z 15 vakcinovaných prasat onemocnělo 5 prasat morem prasat. U těchto prasat a také u kontrolních byly kromě příznaků moru vepřů zjištěny rozsáhlé bronchopneumonické změny oboustranně na předních lalocích plic a částečně i na velkých lalocích plic.

Poměrně příznivý výsledek titračního pokusu podnítil pokus v praxi.

Ve spolupráci s okresním veterinárním zařízením ve Vyškově bylo ve 2 zemědělských závodech naočkováno po 10 prasatech váhy asi 30 kg. V prvním zemědělském závodě byla po dobu 42 dní sledována pouze neškodnost očkovací látky po jednorázové vakcinaci.

V druhém zemědělském závodě byla zvířata v intervalu 49 dní revakcinována a za 82 dní byla na nich po přepravě do Biovety v Nitře provedena předně zkouška účinnosti na červenu vepřů způsobem Fortner—Dinterovým.

Při této zkoušce byla zjištěna jen vyšší odolnost proti července vepřů, neboť teprve za 48 hodin po infekci reagovala mírnými příznaky 3 zvířata a 5 prasat výraznějšími příznaky červeny prasat, jedno prase vykazovalo pouze nepatrné změny v místech skarifikace a 10. prase onemocnělo vůbec.

Za 24 hod. byly sotva znatelné změny podél 2 skarifikačních pruhů pouze u jednoho prasete.

Za 97 dní po druhé vakcinaci (15 dní po infekci červenkou vepřů) byla provedena zkouška účinnosti na mor vepřů.

Při zkoušce účinnosti na mor vepřů onemocněla všechna bivalentně vakcinovaná prasata morem. Tři z nich uhynula 4. den a ostatních šest muselo být nouzově poraženo.

Patologicko-anatomicky byly zjištěny příznaky moru vepřů a u všech chronická bronchopneumonie.

Pokusné vyhodnocení vakcinace bivalentní vakcínou u prasat očkovanych v terénu nebylo úspěšné. Negativní výsledek pokusu nedovolil, aby předně mohlo být v Biovetě přistoupeno k výrobě sdružené (bivalentní) vakcíny a za druhé, aby mohla být taková vakcinace doporučena k současné imunizaci proti července a moru prasat.

Diskuse

Experimentální studie (Rossi — 1961) kombinovaná (simultánní) vakcinace proti července a moru prasat a července a Kloboukové nemoci — nakažlivé obrně vepřů, dokázaly možnost současné imunizace při aplikaci každé očkovací látky zvlášť (— adsorbátové vakcíny proti července vepřů, adsorbátové vakcíny proti nakažlivé obrně — Kloboukové nemoci — a krystalvioleťové vakcíny).

Druhá část pokusů, směřující k zjištění možnosti výroby sdružených vakcín předně proti července a nakažlivé obrně vepřů byla úspěšná. Bylo prokázáno, že lze dosáhnout vysokého stupně imunity po vakcinaci a revakcinaci sdruženou vakcínou proti července a Kloboukové nemoci.

K dalšímu zvýšení produktivity práce a efektivnosti by uvítala veterinární služba zejména sdruženou vakcínou proti července a moru prasat.

V tomto směru byly provedeny pokusy 3 různě vyrobenými sdruženými očkovacími látkami:

a) Krystalvioleťové vakcíny proti moru a adsorbátové vakcíny proti července vepřů s formalínem (*ana partes*).

b) Krystalvioleťové vakcíny proti moru a adsorbátové vakcíny proti července vepřů bez formalínu *aa*.

c) Krystalvioleťové vakcíny proti moru 3 díly a adsorbátové vakcíny proti července vepřů bez formalínu 2 díly.

Výsledek pokusů prokázal uspokojivou imunizační účinnost proti července vepřů a neuspokojivý imunizační účinek proti moru vepřů.

Za důvod neúspěchu byl při použití formolové sdružené vakcíny považován formalin, který svou účinností by mohl narušit imunogenní schopnost vakcíny. Z toho důvodu byly vyrobeny vakcíny bez formolu. Nadějný byl pouze výsledek pokusů provedených v laboratorních poměrech se sdruženou očkovací látkou 3:2 krystalvioleťové vakcíny proti moru a adsorbátové vakcíny proti července prasat, bez formalínu.

V praxi však stejně vyrobená sdružená vakcína, avšak z jiných operačních čísel, naprosto selhala při zkoušce účinnosti proti moru vepřů, provedené za 97 dní po revakcinaci.

Proti července vepřů byla při zkoušce účinnosti proti července vepřů, provedené za 82 dní, zjištěna většinou jen zvýšená odolnost.

Ve veterinární medicíně se používají již sdružené vakcíny např. proti sněti slezině a očím neštovicím, proti tetanu a anthraxu aj. Seznam sdružených vakcín, kterých je možno použít ve veterinární medicíně, se denně zvětšuje.

Nepochybuji však, že pokrok ve vědě umožní při jiném způsobu výroby očkovacích látek a třeba při jiném způsobu očkování, imunizaci proti moru a července vepřů — proti virové a bakteriální infekci jediným úkonem.

Doporučuji proto, stejně jako v roce 1951—1953, aby otázka moru vepřů a imunizaci proti této tak zhoubné nákaze byla věnována trvale pozornost. Považují stále studium terénních virů a jejich patogenních a imunogenních vlastností za zvláště naléhavé, zejména při nových, velkovýrobních poměrech v živočišné výrobě.

Nové poznatky o moru vepřů, který jak se zdá intenzivněji zainteresovává v různých státech více pracovníků, pomohou zvýšit živočišnou výrobu.

Souhrn

1. K zjištění imunizační účinnosti sdružené vakcinace proti července a moru prasat byly vyrobeny 3 sdružené (bivalentní) vakcíny:

a) sdružená (bivalentní) vakcína z krystalvioleťové vakcíny proti moru a formalinové adsorbátové vakcíny proti července prasat stejnými díly,

b) sdružená (bivalentní) vakcína z krystalvioleťové vakcíny proti moru a adsorbátové vakcíny proti července bez formalinu, stejnými díly,

c) sdružená (bivalentní) vakcína z krystalvioleťové vakcíny (3 díly) a z adsorbátové vakcíny proti července vepřů (2 díly) neformalinované.

2. Uvedené očkovací látky byly prověřeny na imunizační účinnost proti července a moru prasat na 130 prasatech a bylo zjištěno, že použití sdružené vakcíny sice imunizuje proti července prasat, avšak proti moru prasat nemohla být prokázána uspokojivá imunizační účinnost.

3. Na základě dosažených výsledků pokusné studie nemohla být sdružená vakcinace uvedenými očkovacími látkami doporučena pro praktické upotřebení.

Došlo dne 20. 6. 1962

Literatura

1. Geiger W. a Poppe N. H.: Berl. und Münch. tztl. Wschr. 1, 1953. — 2. Kolesov S. G.: Veterinarija XXXVIII, 1: 27-29, 1961. — 3. Lysenko P., Cymbal A. M.: Veterinarija XXXVIII, 1: 30-33, 1961. — 4. Rossi L.: Sborník ČSAZV - Veterinární medicína, 1961, 1, Sborník ČSAZV - Veterinární medicína, 1961. — 5. Vědecká diskuse o moru vepřů. Věstník ČSAZV - 1960. Luhačovice 1959.

Объединенная вакцинация двухвалентной вакциной против чумы и рожи свиней

1. Для определения иммунизационной способности объединенной вакцинации против рожи и чумы свиней были изготовлены 3 объединенные (двухвалентные) вакцины:

a) объединенная (двухвалентная) вакцина из кристаллвиолетовой вакцины против чумы и формалиновой адсорбатной вакцины против рожи свиней в равных долях,

б) объединенная (двухвалентная) вакцина из кристаллвиолетовой вакцины против чумы и адсорбатной вакцины против рожи без формалина, в разных долях,

в) объединенная (двухвалентная) вакцина из кристаллвиолетовой вакцины (3 доли) и из адсорбатной вакцины против рожи свиней (2 доли) неформалиновой.

2. Указанные прививочные вещества были проверены на иммунизационное действие против рожи и чумы свиней на 130 свинях и было установлено, что применение объединенной вакцины, хотя и иммунизирует против рожи свиней, к против чумы не удалось установить удовлетворительного иммунизирующего действия.

На основе достигнутых результатов опытных работ объединенную вакцинацию указанными прививочными веществами нельзя было рекомендовать для практического применения.

Die gleichzeitige Vakzinierung mit bivalenter Vakzine gegen Schweinerotlauf und Schweinepest

1. Zur Feststellung der Immunisierungsfähigkeit gleichzeitiger Vakzinierung gegen Schweinerotlauf und Schweinepest wurden 3 Mischvakzinen (bivalente) hergestellt:

a) Mischvakzine (bivalente) aus der Kristallvioletvakzine gegen Schweinepest und der Adsorbatrotlaufvakzine mit Formalin zu gleichen Teilen.

b) Mischvakzine (bivalente) aus der Kristallvioletvakzine gegen Schweinepest und Adsorbatrotlaufvakzine ohne Formalin zu gleichen Teilen.

c) Mischvakzine (bivalente) aus 3 Teilen Kristallvioletvakzine gegen Schweinepest und 2 Teilen Adsorbatrotlaufvakzine ohne Formalin zu gleichen Teilen.

2. Die angeführten Impfstoffe wurden auf ihre Immunisierungswirkung gegen Schweinerotlauf und Schweinepest an 130 Schweinen überprüft und es wurde festgestellt, daß die Mischvakzinen zwar gegen Schweinerotlauf immunisieren, gegen Schweinepest jedoch konnte kein befriedigendes Immunisierungsvermögen bewiesen werden.

3. Auf Grund der erzielten Forschungsergebnisse konnte die gleichzeitige Immunisierung mit den angeführten Mischvakzinen gegen Schweinerotlauf und -pest der Praxis nicht anempfohlen werden.

Trvanie imunity po jednorázovom očkovaní živou WR2 vakcínou proti červienke ošípaných

Продолжительность иммунитета после разовой прививки живой неvirulentной
вакциной против рожи свиней

Die Immunitätsdauer nach einmaliger Impfung mit lebendiger avirulenter Vakzine
gegen den Rotlauf

Zdeněk NOVÁK, Alojz ŽUFFA, Adolf ZÁMEČNÍK
Bioveta n. p. v Nitře, ředitel MVD. E. Wágner

Úvod

V r. 1960 začalo sa u nás s pokusným očkovaním živou červienkovou vakcínou, pripravenou ze slabo virulentného kmeňa WR2. O biologických a imunologických vlastnostiach tejto vakcíny (ŽČV) sme referovali v predošlej práci (Žuffa a spol. 1960). Roku 1960 sa ŽČV použila na ochranné očkovanie ošípaných socialistického sektoru v okrese Bratislava-okolie a v r. 1961 sa pokusné očkovanie rozšírilo na jednu veľkovýkrmňu v Západočeskom kraji a niekoľko chovov socialistického sektoru Stredoslovenského kraja. Pre rok 1962 sa plánuje ďalšie rozšírenie ochranného očkovania touto vakcínou. O skúsenostiach s použitím ŽČV získaných v rámci pokusného očkovania, budeme referovať na inom mieste (Žák a spol. 1961).

Pri štúdiu imunologických vlastností ŽČV v laboratorných podmienkach sa ukázalo, že veľmi dobre imunizuje myšky a ošípané (Žuffa a spol. 1960); pritom sme však nezisťovali, ako dlho trvá imunita po vakcinácii. V tejto práci predkladáme výsledky vyšetrovaní, ktorých účelom bolo zistiť trvanie imunity po jednorázovom očkovaní ošípaných ŽČV.

Popis pokusov a dosiahnuté výsledky

Na farme ošípaných, patriacej ŠM v A., očkovali sme 180 odstavčiat ŽČV v dávke 1,0 ml s. c. jednorázovo. Zdravotný a výživný stav očkovaných zvierat bol vyhovujúci; priemerná živá váha očkovancov bola okolo 25 kg (12–25 kg). Za 2, 3, 5 a pol a 7 a pol mesiaca po očkovaní vykúpili sme po 6, 6, 10, 10 a 10 ošípaných a podrobili ich vyvolávajúcej infekcii. Ďalej sme podrobili vyvolávajúcej infekcii po 12 ošípaných z 2 chovov JRD, očkovaných touto vakcínou pred 5 mesiacmi.

Na vyvolávajúcu infekciu pokusných ošipaných metódou Fortnerovou a Dintorovou sme použili virulentné červienkove kmene B—5, Motol a Gottwaldov, ktoré sa na našom pracovisku bežne používajú pri titráciách očkovacích látok proti červienke ošipaných. Na infekciu sme brali 18 hod, sérobujónové kultúry a v dávke 0,2 ml sme ich vtierali do 3 skarifikačných rýh; čtvrtú rýhu sme nechali neinfikovanú ako kontrolu. Po infekcii sme odčítali kožné reakcie denne počas 4 dní a súčasne sme zvieratám merali telesnú teplotu.

Pri hodnotení imunitného stavu zaraďovali sme do skupiny imúnnych zvierat aj tie, u ktorých došlo k vývoju miernych lokálnych reakcií bez vzostupu telesnej teploty. Za vnímavé sme považovali zvieratá, u ktorých došlo k vývoju silných alebo veľmi silných lokálnych reakcií, a to aj vtedy, ak u nich nedošlo k zvýšeniu telesnej teploty.

Výsledky našich vyšetrení sú zhrnuté v tab. I a II.

Z tab. I vidieť, že všetkých 6 zvierat bolo za 2 mesiace *p. v.* úplne chránených proti vyvolávajúcej infekcii červienkou ošipaných; zo 6 zvierat infikovaných za 3 mesiace *p. v.* reagovali 2 a z 10 zvierat infikovaných za 5 mesiacov reagovali 3 vývojom miernych lokálnych reakcií, prejavujúcich sa opuchom

I. Trvanie imunity po jednorázovom očkovaní avirulentnou červienkovou vakcínou

Infekcia za mesiacov po vakcinácii	Reakcie po perkut. infekcii				Spolu	
	žiadne*	slabé	silné	veľmi silné	imúnnych	neimúnnych
2	6	—	—	—	6	—
Kontroly	—	—	—	6	—	6
3	4	2	—	—	6	—
Kontroly	—	—	1	4	—	5
5	7	3	—	—	10	—
Kontroly	2	—	1	7	2	8
6,5	6	2	2	—	8	2
Kontroly	1	1	—	4	2	4
7,5	5	3	2	—	8	2
Kontroly	—	—	4	6	—	10

* Za imúnne sme považovali zvieratá, ktoré po perkutánnej infekcii nereagovali, alebo reagovali len slabó.

II. Imunita u ošipaných vo 2 chovoch JRD za 5 mesiacov po vakcinácii avirulentnou červienkovou vakcínou

Chov	Počet ošipaných	Reakcie po perkut. infekcii				Spolu	
		žiadne	slabé	silné	veľmi silné	počet imún.	počet neimún.
A	12	8	2	2	—	10	2
B	12	8	2	2	—	10	2
Kontroly	6	1	1	—	4	2	4

a zčervenáním kože v priebehu rýh, ale bez zvýšenia telesnej teploty, ktoré odznali do 72 hod. *p. i.* bez ošetrovania. Z 10 ošipáných infikovaných za 6 a pol mesiaca po očkovaní, reagovali 2 vývojom miernych, a 2 vývojom silných lokálnych reakcií, a z 10 ošipáných infikovaných za 7 a pol mesiaca, reagovali 3 vývojom slabých a 2 vývojom silných miestnych reakcií. Zo 42 ošipáných imunizovaných ŽČV, ktoré boli podrobené vyvolávajúcej infekcii červienkou za rozličný čas *p. v.*, bolo imúnnych 38; z 37 súčasne infikovaných neošetrených kontrol nereagovali len 4 zvieratá.

Z tab. II vidieť, že z 24 ošipáných, vykúpených z 2 chovov JRD za 5 mesiacov po očkovaní ŽČV, bolo úplne chránených proti vyvolávajúcej infekcii červienkou 16 zvierat. U 4 ošipáných došlo k vývoju miernych a u 4 k vývoju silných lokálnych reakcií.

Diskusia

Pri hodnotení imunogenity komerčnej červienkovej formoladsorbátovej vakcíny, vyrábanej Biovetou n. p. v Nitre a ŽČV, infekciou ošipáných robenou za krátky čas po očkovaní, nezaznamenali sme rozdielov v účinnosti oboch vakcín. Obe vakcíny podané v normálnej aj zníženej vakcinačnej dávke chránili očkované zvieratá úplne proti vyvolávajúcej infekcii (Žuffa a spol., 1960). Pri rovnakom spôsobe hodnotenia tých istých preparátov došiel Isopescu a spol. (1957) k záveru, že obe vakcíny sú čo do imunizačnej účinnosti rovnako hodnotné. Keď sa však vyvolávajúca infekcia imunizovaných zvierat robila za rozličný čas po očkovaní, ukázalo sa, že imunita po jednorázovej aplikácii červienkovej adsorbátovej vakcíny netrvá dlhšie ako 3—4 mesiace a u revakcinovaných zvierat nie dlhšie ako 5—7 mesiacov (Malík a spol., 1961, Rossi, 1959). Výsledky našich vyšetrovaní svedčia pre to, že imunita po jednorázovom očkovaní ŽČV trvá dlhšie ako 7 a pol mesiaca, pretože vyvolávajúcej infekcii, robenej v tom čase, odolalo ešte 80 % vakcinovaných zvierat. Znamená to, že jednorázové očkovanie výkrmových ošipáných ŽČV stačí na ochranu pred červienkovou infekciou až do dosiahnutia jatočnej váhy. Lawson a spol. (1958) udávajú, že imunita po aplikácii živej vakcíny, pripravennej z kmeňa Cl, trvá aspoň 6 mesiacov. Naproti tomu imunita vyvolaná po očkovaní Staubovou avirulentnou červienkovou vakcínou trvá len 3—4 mesiace (Travinskí, Kobusiewicz, Steffen, cit. podľa Ehrsama 1958). Aj avirulentné červienkové kmene EVA a AVR9 ukázali sa imunogénne menej účinné ako kmeň WR2 (Žuffa a spol., 1960).

Vhodnosť inaktivovaných aj živých vakcín k ochrannému očkovaniu proti červienke ošipáných z nákazového hľadiska sme rozobrali v predošlej práci (Žuffa a spol., 1960). Pri ubikvatórnom výskyte virulentných červienkových baktérií a po sklamaní nádejí, že všeobecným a povinným používaním inaktivovaných vakcín proti červienke ošipáných podarí sa likvidovať červienku ako nákazu (Demnitz, Schröder, cit. podľa Ehrsama, 1958) niet proti použitiu živej červienkovej vakcíny vedecky zdôvodnených námetok. Ak hodnotíme použitie živej a inaktivovanej vakcíny z ekonomického hľadiska, treba dať prednosť použitiu vakcíny živej. Úspory pri použití živej vakcíny spočívajú v znížení nákladov na jej výrobu, v jej menšej spotrebe, s nahradením dvojrázového očkovania jednorázovým. Skutočnosť, že živou vakcínou stačí očkovať raz, sa priaznivo prejaví ako pri zvýšení pracovného výkonu terénnej veterinárnej služby, ktorá pri znížení vakcinačných zákrokov o niekoľko miliónov ročne, môže sa venovať iným náliehavým úlohám pri tmení hospodársky dôležitých nákaz, ako aj zlepšením hospodárskych výsledkov vo výkrme ošipáných, pretože odpadá jedno vyrušovanie a zafažovanie zvierat. K tomu treba pripočítat ešte straty na mäse, ktoré vznikajú po použití adsorbátovej vakcíny pri porážke zvierat konfiškáciou patologicke zmenených tkaní v mieste inokulácie vakcíny vo forme uzlíkov rozličnej veľkosti, prípadne opúzdrených hnisavých ložisiek.

Pri dnešnej snahe o prípravu bi- a polyvalentných vakcín pre veterinárne účely poskytuje živá vakcína proti červienke lepšie perspektívy ako vakcíny inaktivované. Schopnosť živej vakcíny vyvolať hlbokú a dlhotrvajúcu imunitu jednorázovou aplikáciou malého množstva očkovacej látky, dovoľuje kombinovať do pri-

jateľnej inokulačnej dávky viac druhov vakcín (Žuffa a spol., 1961). Pri polyvalentných očkovacích látkach z inaktivovaných vakcín naráža sa okrem iného aj na ťažkosti, že ich kombináciou zvyšuje sa imunizačná dávka na objem, ktorý sa dá ťažko aplikovať jednou inokuláciou.

S ú h r n

Jednorázové očkovanie avirulentnou červienkovou vakcínou z kmeňa WR2 vyvolá solídnu imunitu, trvajúcu u vysokého percenta očkovaných viac ako 7 a pol mesiaca.

Diskutuje sa o výhodách použitia avirulentnej červienkovej vakcíny v imunoprofylaxii červienky ošipáných.

Došlo dňa 20. 6. 1962

L i t e r a t ú r a

1. Ehrsam H. R.: Schweiz. Arch. Tierheilk. 100, 202, 1958. — 2. Isopescu I.: An. Inst. Ser. Vacc. Pasteur Bucuresti 1, 235, 1957. — 3. Lawson K. F.: Canad. J. comp. Med. 22, 164, 1958. — 4. Malík Z., Severín M.: Osobné oznámenie, 1961. — 5. Rossi L.: Osobné oznámenie, 1958. — 6. Žák O., Žuffa A.: Výsledky doteraz nepublikovaných zistení z terénu, 1961. — 7. Žuffa A., Novák Z., Rajtar V., Vet. Čas. 9, 447, 1960. — 8. Žuffa A., Novák Z.: V tlači, 1961.

Продолжительность иммунитета после разовой прививки живой неvirulentной вакциной против рожи свиней

Разовая прививка неvirulentной вакциной штамма WR2 против рожи свиней вызывает солидный иммунитет, продолжающийся у высокого процента привитых свиней свыше 7,5 месяцев.

Обсуждаются преимущества использования неvirulentной вакцины против рожи свиней в иммунопрофилактике этого заболевания.

Die Immunitätsdauer nach einmaliger Impfung mit lebendiger avirulenter Vakzine gegen den Rotlauf

Die einmalige Impfung mit avirulenter Schweinerotlaufvakzine des WR 2-Stammes ruft eine solide Immunität hervor, die bei einem hohen Prozentsatz der geimpften Tiere mehr als 7 und halb Monate dauert.

Man diskutiert über die Vorteile der Anwendung der avirulenten Rotlaufvakzine in der Immunoprophylaxe des Schweinerotlaufs.

Biochemické studie o července vepřů

VI. Z imunologie proti července vepřů

Биохимическое исследование рожи свиней

VI. Вопросы иммунологии против рожи свиней

Biochemische Studie über den Schweinerotlauf

VI. Aus der Immunologie gegen den Schweinerotlauf

Dušan KALÁB, prom. chemik, MVDr. Ladislav STAROŠTÍK

Bioveta ved. n. p., Ivanovice na Hané, ředitel MVDr. V. Marjánek

Ú v o d

Pokusy o imunizaci zvířat proti července vepřů chemicky izolovanými antigeny získanými z bakteriálních buněk *Erysipelothrix rhusiopathiae suis* nebyly dosud úspěšné (6, 9). Během chemické izolace dochází pravděpodobně k inaktivaci, jež má za následek porušení jejich imunizačních schopností. Z prací některých autorů však vyplývá, že při imunizaci proti července vepřů se uplatňuje též rozpustný antigen produkovaný červenkovými bakteriemi během jejich růstu do živného prostředí. Tak Traub (8) ukázal, že pokusné myši i vepři byli aktivně imunizováni červenkovými kulturami precipitovanými hydroxydem hlinitým a že jak bakteriální buňky, tak i rozpustný antigen přítomný v těchto kulturách jsou nutné pro přípravu plně aktivních vakcín. Jak uvádí později Gledhill (3) indukuje rozpustný antigen přítomný v kulturách červenkových bakterií u králíků tvorbu protilátek chránících pokusné myši a aglutinujících suspenze *Erysipelothrix rhusiopathiae suis*. Tento rozpustný antigen je termolabilní a připomíná podle Gledhilla (2, 3) L-antigen, od něž se liší pouze tím, že se nachází přímo v tekuté živné půdě, nikoliv jen na povrchu bakteriálních buněk. Rozpustný antigen vyvázaný hydroxydem hlinitým poskytl účinnou vakcínu. Bakteriální buňky zbavené živné půdy a precipitované hydroxydem hlinitým poskytovaly poněkud účinnější vakcíny. Autor se domnívá, že vysoce hodnotné vakcíny dávají pouze ty kmeny červenky, jejichž bakteriální buňky produkují a na svém povrchu udržují co nejvíce L-antigenu. Podle Wiidika (10) závisí imunizační schopnost červenkového kmene AV/R₉ na dvou faktorech, z nichž jeden je vázaný na bakteriální tělo a druhý na substanci uvolňovanou z červenkových bakterií do kultivačního media. K obdobným závěrům

dochází též Becker (1). Pokusili jsme se proto ověřit si u dvou kmenů *Erysipelothrix rhusiopathiae suis* imunizační schopnosti jednotlivých složek jejich bakteriálních kultur. Některé z antigenních složek jsme sledovali též sérologicky.

Pokusná část

Metodika

Použité červenkové kmeny:

Kmen VR₂ (Bukurešť): slabě virulentní pro myšky a holuby, avirulentní pro vepře, patří mezi kmeny sérologického typu N.

Kmen B₅: výrobní vakcinový kmen, virulentní pro vepře, patří mezi kmeny sérologického typu B.

Kmen M-14: používá se pro infekci pokusných myšek, podle našich sérologických vyšetření patří ke kmenům typu B.

Kmen VRB-175: používá se pro infekci vepřů, podle našich sérologických zkoušek jsme jej zařadili mezi kmeny typu A.

Příprava a zpracování červenkových kultur:

Vybrané kmeny červenkových bakterií jsme kultivovali v živné půdě založené na pankreatinovém hydrolyzátu koňského masa s 1% Bactopeptonu 1300-Organofarma-Praha, obsahujícím 10% pepsinem natráveného normálního koňského séra o 5,0 % glukózy. Výsledné pH bujóny činilo 7,7. Inokulum bylo připraveno na živné půdě téhož složení, bez glukózy. Vlastní pomnožování probíhalo v tanku obsahujícím 6 litrů půdy po inokulaci 8–10 ml inokula, při teplotě 37° C. Abychom udrželi příznivé pH živné půdy po celou dobu růstu, přidali jsme k půdě bromthymolovou modř (100 mg/6 litrů) k barevné indikaci jeho změn a pH půdy upravovali čpavkovými parami. Promývačka s koncentrovaným amoniakem (25%) byla proháněna vzduchem a stržený amoniak filtrován před vstupem do tanku s kulturou vatovým filtrem. Při okyselování živné půdy během růstu červenkových bakterií dochází k barevné změně indikátoru z modrozelené do žluté, již pak vracíme do původních alkalických hodnot amoniakem tak dlouho, až se barevné změny neprojeví a růst kultury je ukončen, což bývá průměrně do 24 hodin. Po mikroskopických a kultivačních zkouškách čistoty narostlé bakteriální kultury obsah kultivačního tanku odstředíme na průtokové odstředivce „Jihostroj“ při 30.000 obrátkách za minutu. Tím získáme čistý supernatant a oddělíme bakterie. Bakterie pak rozptýlíme ve fyziologickém roztoku stejného objemu, který měla odstřeďovaná kultura.

Imunizační pokusy na myškách:

V pokusech s bílými myškami jsme sledovali imunogenní schopnosti čistého supernatantu, dále bakterií resuspendovaných ve fyziologickém roztoku a kultury jako celku. Poté pak supernatantu, bakterií ve fyziologickém roztoku a celé kultury, jak po přidání 2000 m. j. penicilinu/ml, tak také po přidání 20% hydroxydu hlinitého s 0,2 % formalinu. Myšky byly očkovány dávkami 0,2 ml s. c. na hřbet, po očkování pozorovány 21 dnů a poté přímo infikovány lyofilizova-

ným červenkovým kmenem M-14, který zředěný před použitím fyziologickým roztokem v poměru 1 : 140 usmrcuje kontrolní myšky do 72 hodin. Infekce byla provedena 0,2 ml *i. p.* Myšky byly sledovány 14 dnů po infekci a z uhynulých myšek byly prováděny kultivace.

Příprava králíčích sér k sérologickým zkouškám:

Červenkové kultury jsme pomnožovali na polosyntetické tekuté živné půdě, jež měla za základ enzymatický hydrolyzát kaseinu s glukózou a „Tweenem 80“ jako růstovým faktorem podle Keitaro Ando a spol. (5). Králíky jsme imunizovali jednak supernatantem z červenkové kultury VR₂ a jednak celou kulturou kmene B₅ (v prvních 6 injekcích umrtvenou formalínem). V období 2 měsíců obdrželi králíci po 150 ml antigenů, z nichž polovina byla podána *s. c.* a druhá polovina *i. v.* Krev byla odebrána z ušní vény a sérum získáno běžným způsobem.

Sérologické zkoušky:

Kapková aglutinace: 16hodinové kultury červenky vyrostlé na Tryptose-Broth, Difco, odstředěné a zahuštěné na obsah 10 miliard zárodků/ml, jsme zkoušeli rychlou kapkovou aglutinací se specifickými i nespecifickými séry.

Imunochemické zkoušky:

Precipitace v agaru: Použili jsme metody dvojité difúze na agarové misce podle Ouchterlonyho (7). Průměr misek činil 55 mm.

Extrakt z bakteriálních buněk *Erysipelothrix rhusiopathiae suis* jsme připravili N/20 kyselinou chlorovodíkovou za varu na vodní lázni podle předpisu uvedeného v Mikrobiologických vyšetřovacích metodách Johnem (4).

V ý s l e d k y

Pokusy s kmenem VR₂.

Imunizační pokusy na myškách:

Jednotlivé antigenní složky pro imunizační pokusy jsme zpracovali tak, že vzniklo celkem devět vzorků použitých k očkování laboratorních myšek: Supernatant (S), supernatant s 2000 m. j. penicilinu/ml (S—Pn) a supernatant s 20 % hydroxydu hlinitého a 0,2 % formalínu (S—Al(OH)₃). Resuspendované bakterie (Bs), bakterie s 2000 mj. j. penicilinu/ml (Bs—Pn) a bakterie s 20 % hydroxydu hlinitého a 0,2 % formalínu (Bs—Al(OH)₃). Kultura jako celek (K), kultura s 2000 m. j. penicilinu/ml (K—Pn) a kultura s 20 % hydroxydu hlinitého a 0,2 % formalínu (K—Al(OH)₃).

Kultivačním vyšetřením jednotlivých vzorků před očkováním myšek jsme zjistili, že pouze kultura K je živá. Výsledky pokusu shrnuje tabulka I. Z tabulky I je patrné, že samotná kultura K je pro myšky mírně patogenní, což souhlasí s údaji literatury. Dobré imunizační schopnosti po infekci vyvolané lyofilizovaným červenkovým kmenem M-14 měly pouze vzorky: K, K—Pn, S a S—Pn. Lze se tedy domnívat, že jak v kultuře K, tak i v supernatantu S je přítomna substance, jejíž imunizační schopnosti nejsou olivněny přidáním penicilinu, ale po přidání hydroxydu hlinitého s formalínem se ruší. Po aplikaci vzorku obsahujícího samotné bakterie Bs, dále Bs—Pn i Bs—Al(OH)₃ k tvorbě imunity u myšek nedošlo.

I. Pokus s kmenem VR₂

Zkoušená antigenní složka	Počet očkovaných myšek	Počet infikovaných myšek	Průběh po infekci						Procento přežití
			24	48	72	96	120	144 hod.	
Kultura K	10	7 (3 uhynuly po očkování)							
K—Pn	10	10	—	—	—	—	—	—	100%
K—Al(OH) ₃	10	10	—	—	—	1	—	—	90
			—	1	2	2	3	1	10
Supernatant S	10	10	—	—	—	—	—	—	100%
S—Pn	10	10	—	—	—	—	—	—	100
S—Al(OH) ₃	10	10	—	—	8	2	—	—	0
Bakterie	10	10	—	1	5	4	—	—	0%
Bs—Pn	10	10	—	1	6	3	—	—	0
Bs—Al(OH) ₃	10	10	—	1	5	4	—	—	0
Kontroly		10	—	2	8	—	—	—	0%

Sérologické zkoušky:

Sérum králíka imunizovaného supernatantem z kultury kmene červenky RV₂ dávalo při rychlé kapkové aglutinaci ihned pozitivní reakci s mladými červenkovými bakteriemi všech tří sérologických typů.

Imunochemické zkoušky:

Při precipitaci v agaru podle Ouchterlonyho dochází mezi sérem králíka imunizovaného supernatantem z červenkové kultury VR₂ a mezi antigeny obsaženými s supernatantech červenkových kultur všech tří sérologických typů k vzniku zřetelné precipitační zóny během 48 hodin při laboratorní teplotě. Uvedené králíčí sérum nedává precipitační reakci v kontrole s čistou živnou půdou, ani s antigeny připravenými kyselou extrakcí (4) bakteriálních buněk červenkových kmenů VR₂, B₅, ani VRB-175.

Pokusy s kmenem B₅.

Imunizační pokusy na myškách:

Pomnožení bakterií, centrifugace kultury i celé zpracování jejích složek k imunizaci pokusných myšek bylo provedeno stejně jako u předešlého pokusu s kmenem VR₂. Označení jednotlivých vzorků je rovněž analogické. Výsledky pokusu shrnuje tabulka II. Na rozdíl od pokusů s kmenem VR₂ měly dobré imunizační vlastnosti vzorky K—Al(OH)₃ a S—Al(OH)₃. Vzorek Bs—Al(OH)₃ imunizoval myšky jen částečně. Po aplikaci ostatních vzorků nedošlo u myšek k vytvoření imunity. Z pokusů je patrné, že samotný supernatant S, bez přidání hydroxydu hlinitého s formalínem v tomto případě neimunizuje.

Sérologické zkoušky:

Sérum králíka imunizovaného kulturou kmene B₅ dávalo při rychlé kapkové aglutinaci ihned pozitivní reakci se suspenzemi mladých červenkových bakterií všech tří sérologických typů.

II. Pokus s kmenem B₅

Zkoušená antigenní složka	Počet očkova- ných myšek	Počet infikova- ných myšek	Průběh po infekci								Pro- cento přežití
			24	48	72	96	120	144	168	192hod.	
Kultura K	10	10	-	3	7	-	-	-	-	-	0%
K-Pn	10	10	-	6	4	-	-	-	-	-	0
K-Al(OH) ₃	10	10	-	-	-	-	1	-	-	-	90
Supernatant S	10	10	2	6	2	-	-	-	-	-	0%
S-Pn	10	10	-	6	4	-	-	-	-	-	0
S-Al(OH) ₃	10	10	-	-	-	-	-	-	-	-	100%
Bakterie Bs	10	10	-	5	2	1	1	-	1	-	0%
Bs-Pn	10	10	-	7	3	-	-	-	-	-	0
Bs-Al(OH) ₃	10	10	-	-	-	-	-	-	2	3	50
Kontroly		10	2	3	5	-	-	-	-	-	0%

Imunochemické zkoušky:

Při precipitaci v agaru podle Ouchterlonyho dochází mezi sérem králíka imunizovaného celou kulturou červenkového kmene B₅ a mezi antigeny obsaženými v supernatantech kultur červenky všech tří sérologických typů k tvorbě precipitační zóny již během 48 hodin při laboratorní teplotě. Uvedené králíčí sérum nedává precipitační reakci v kontrole s čistou živnou půdou. Precipitační reakce s kyselými extrakty červenkových bakteriálních buněk (4) kmenů B₅ a M-14 byla pozitivní, zatímco u analogických extraktů z červenkových kmenů VR₂ a VRB-175 k tvorbě precipitační zóny nedošlo.

Precipitace v agaru s hyperimunním homologním červenkovým sérem.

Precipitaci v agarové misce jsme dále zkoušeli homologní hyperimunní séra proti července vepřů vyrobená jednak v Biovetě, n. p., v Ivanovicích na Hané, jednak v NDR. K přípravě ivanovického séra bylo při hyperimunizaci použito všech tří sérologických typů červenky.

Oba druhy červenkových sér dávaly do 48 hodin při laboratorní teplotě zřetelné precipitační zóny s antigeny přítomnými v supernatantech kultur všech tří sérologických typů červenky. Kontrolní reakce s čistou živnou půdou byla negativní. Agarové precipitační reakce s extrakty bakteriálních buněk červenkových kmenů VRB-175, B₅ a VR₂ byla rovněž u všech těchto tří sérologických typů červenkových bakterií pozitivní.

Diskuse

Závěrem lze říci, že u červenkových kmenů VR₂ a B₅ je přítomna imunizující substance i mimo těla bakterií. Tato imunizující substance z kmene B₅ virulentního pro vepře, imunizovala pouze ve spojení s hydroxydem hliníovým a formalínem a jak se zdá, je vázána částečně též na samotné bakterie s hydroxydem hliníovým a formalínem. Tato naše zjištění jsou

v souhlase s názory Gledhilla (3), který ve své práci uvádí, že rozpustný antigen přítomný v červenkových kulturách odpovídá pravděpodobně termolabilnímu L-antigenu, popisovanému dříve (2) ve spojení s povrchem bakteriálních buněk. V červenkových kulturách, poskytujících vysoce aktivní vakcíny, podržují si bakterie po oddělení kultivačního media ve značné míře na svém povrchu L-antigen. Supernatanty pak poskytují účinné vakcíny tehdy, uvolní-li bakterie ze svého povrchu L-antigen do media. Autor rovněž předpokládá, že množství L-antigenu zadrženého bakteriálními buňkami je kolísavé. Obdobně jak uvádí Gledhill (3), zjistili jsme i v naší práci, že supernatant z červenkové kultury kmene VR₂ vyvolává u králíka tvorbu specifických protilátek, jež se dají prokázat rychlou kapkovou aglutinací. Dále jsme se pokusili o imunochemické sledování těchto protilátek — precipitací v agaru. Jak je patrné z našich pokusů, jsou podstatné rozdíly mezi reakcemi antigenů připravenými kyselou reakcí červenkových bakteriálních buněk a reakcemi rozpustného antigenu přítomného v supernatantech.

Sérum králíka imunizovaného supernatantem z červenkové kultury kmene VR₂ dávalo při precipitaci v agaru precipitační zóny pouze s antigeny přítomnými v supernatantech červenkových kultur (všech tří sérologických typů), zatímco precipitační reakce s antigeny připravenými kyselou extrakcí z bakteriálních buněk byly negativní. Sérum králíka imunizovaného celou kulturou kmene B₅ precipitovalo v agaru s antigeny obsaženými v supernatantech červenkových kultur všech tří sérologických typů i s antigeny připravenými kyselou extrakcí z buněk bakterií červenkových kmenů B₅ a B-14, náležejících do sérologického typu B.

Je tedy pravděpodobné, že antigenní složka přecházející do supernatantu u červenkových kultur různých sérologických typů bude shodná, neboť podle našich pokusů dochází při její difúzi v agaru ve všech sledovaných případech k pozitivním precipitačním reakcím se sérem králíka imunizovaného supernatantem z kultury červenkového kmene VR₂. Z našich imunizačních pokusů vyplývá, že určité kmeny *Erysipelothrix rhusiopathiae suis* by mohly sloužit k přípravě očkovací látky neobsahující ani živé, ani mrtvé červenkové bakterie.

Při precipitačních pokusech v agaru jsme v homologních hyperimunních červenkových sérech zjistili přítomnost protilátek proti antigenům ze supernatantů kultur červenkových bakterií všech tří sérologických typů. Předmětem naší práce bude zjištění, v jakém vztahu jsou tyto protilátky k hodnotě hyperimunního séra proti července vepřů.

Souhrn

Pokusy na laboratorních myškách jsme potvrdili přítomnost rozpustného imunizujícího antigenu, jenž přechází při růstu *Erysipelothrix rhusiopathiae suis* do tekutého živného media.

Tento antigen vyvolává u králíků tvorbu specifických protilátek, které lze prokázat aglutinací a též imunochemicky — precipitací v agaru. Rovněž v komerčních homologních hyperimunních sérech proti července vepřů jsme precipitací v agaru zjistili přítomnost specifických protilátek proti tomuto rozpustnému antigenu.

Došlo dne 20. 6. 1962

Literatura

1. Becker M., 1960: Unsere Rotlaufimpfstoffe I, II, Mh. Veterinärmed., 15, 7-18, 58-65. — 2. Gledhill A. W., 1947: Some properties of thermolabile antigen of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. J. gen. Microbiol., 1, 211-220. — 3. Gledhill A. W., 1952: The immunizing antigens of the *Erysipelothrix rhusiopathiae*. The role of the L-antigen. J. gen. Microbiol. 7, 179-193. — 4. John C. cit. podle: Mikrobiologické vyšetřovací metody, str. 303, SZN, Praha, 1958. — 5. Keitaro Ando et. al., 1959: Studies on the effect of Tween 80 on the growth of *Erysipelothrix rhusiopathiae*. Japan. J. Microb., 3, 85-93. — 6. Müller H. D. et. al., 1961: Untersuchungen an den Plasmolyse-Autolyse-Produkten der Rotlaufbakterien. Arch. exp. Veterinärmed., Bd. XV., 4, 797-803. — 7. Ouchterlony O., 1949: Acta path. microbiol. scand., 26, 507-516, cit. podle: Mikrobiologické vyšetřovací metody, str. 111, SZN, Praha, 1958. — 8. Traub E., 1947: Immunisierung gegen Schweinerotlauf mit konzentrierten Adsorbatimpfstoffen. Mh. Veterinärmed., 2, 165. — 9. Trusczyński M., 1959: Referát, XVI. Congresso Mundial de Vet., Madrid, Vol. II., Sect. II. z, 505-507. — 10. Wiidik R. W., 1958: Weitere Untersuchungen über den schwedischen avirulenten Rotlaufimpfstoff AV/R9. Zbl. Veterinärmed., 5, 1-16.

Биохимическое исследование рожи свиней

VI. Вопросы иммунологии против рожи свиней

В опытах с лабораторными мышами мы подтвердили наличие растворимого иммунизирующего антигена, который попадает при росте *Erysipelothrix rhusiopathiae suis* в жидкую питательную среду.

Этот антиген вызывает у кроликов образование специфических антител, которые можно достоверно установить агглютинацией, а также иммунохимически — путем преципитации на агаре.

Также в коммерческих гомологических гипериммунных сыворотках против рожи свиней мы путем преципитации на агаре установили наличие специфических антител против этого растворимого антигена.

Biochemische Studie über den Schweinerotlauf

VI. Aus der Immunologie gegen den Schweinerotlauf

Mittels Versuche auf den Labormäuschen haben wir die Anwesenheit eines löslichen immunisierenden Antigens bestätigt, das beim Wachstum von *Erysipelothrix rhusiopathiae suis* in ein fließendes Nährmedium übergeht.

Dieses Antigen ruft bei den Kaninchen die Ausscheidung von spezifischen Antikörpern hervor, die durch Agglutination und auch immunochemisch — durch Präzipitation im Agar — bewiesen werden können.

Gleichfalls in den kommerziellen homologen hyperimmunen Seren gegen den Schweinerotlauf haben wir mittels Präzipitation im Agar die Anwesenheit von spezifischen Antikörpern gegen dieses lösliche Antigen festgestellt.

Příspěvek k hodnocení aktivity tuberkulínů

К вопросу оценки активности туберкулинов

Contribution à l'évaluation de l'activité des tuberculins

MVDr. Milan PAVLAS

Technická spolupráce: Patloková Vlasta

*Oddělení pro tuberkulózu Výzkumného ústavu veterinárního lékařství v Brně,
ředitel doc. MVDr. J. Vlček.*

Ú v o d

Nezbytným předpokladem úspěšné eradikace a prevence tuberkulózy je, abychom měli k dispozici tuberkulíny se spolehlivými alergenogenními vlastnostmi. Přitom je zejména důležité, aby tuberkulín měl přiměřenou aktivitu, která by byla v chovech zamořených tuberkulózou zárukou odhalení všech nakažených zvířat. Naproti tomu v chovech prostých tuberkulózy je důležité, aby použitý tuberkulín byl dostatečně specifický a nevyvolával pozitivní nebo dubiozní reakce u skotu tuberkulózy prostého.

Je proto pochopitelné, že i ve státech prakticky již tbc prostých, i se značným výskytem tuberkulózy, se věnuje hodnocení a titraci tuberkulínů mimořádná pozornost.

V současné době se používá v jednotlivých státech různých druhů tuberkulínů, a to zejména tuberkulínů čistěných PPD, albumóz prostých a tuberkulínu vetus, který se však stále více nahrazuje tuberkulíny čistěnými. Jako hlavní důvod zavádění čistěných tuberkulínů do diagnostiky se uvádí snadnější standardizace a větší spolehlivost. Řada autorů došla k tomuto závěru při srovnávání aktivity tuberkulínů vetus a čistěných PPD tuberkulínů, a to jak na skotu, tak i na morčatech, kde dosáhla výrazně lepších výsledků při použití tuberkulínů čistěných. Přitom čistěnými tuberkulíny bylo dosaženo v určitých případech v chovech skotu zamořených tuberkulózou až o 10, 20, 30 a více procent pozitivních výsledků ve srovnání s tuberkulínem vetus (Rossi — 1961, Ivanov — 1959, Kirillov — 1960). Zejména výrazných rozdílů bylo dosaženo při použití čistěných — komplexních tuberkulínů s množstvím 6 mg tuberkuloproteinu na 1 ml tuberkulínu.

Všechny shora uvedené údaje svědčily pro to, aby i u nás v ČSSR byl urychleně zaveden do diagnostiky tuberkulózy čistěný tuberkulín.

Přihlížíme-li však k údajům v literatuře o vzájemném ovlivnění reakcí při intradermální tuberkulinaci ředěnými a neředěnými tuberkulíny při současné jejich aplikaci (Kress, Mathois, Stöckel — 1960, Bederke — 1960, Beerwerth — 1958, Meyn — 1961, Schliesser — 1954), je nutno kriticky hodnotit i údaje o spolehlivosti tuberkulínů, a to jak vetus, tak čistěných.

Úkolem naší práce bylo zjistit, do jaké míry dochází ke vzájemnému ovlivnění tuberkulinových reakcí při současné aplikaci čistěných PPD a vetus tuberkulínů. Zároveň jsme se snažili posoudit diagnostickou spolehlivost obou druhů tuberkulínů.

Metodika

K pokusům bylo použito 192 kusů skotu, které byly ustájeny ve dvou tuberkulózních izolátech. Dospělá zvířata byla ustájena v těchto stájích po předchozím pozitivním výsledku tuberkulinace. Při klinickém vyšetření byly zjištěny klinicky zjevné změny na dýchacím ústrojí u 30 % dospělého skotu.

Uvedený skot byl rozdělen do šesti skupin po 32 zvířatech. Každá skupina zvířat byla rozdělena do dvou podskupin A a B. V podskupině A byl skot starší 2 roků, v podskupině B skot ve stáří do dvou roků.

Ve skupině I. byl použit 50% tuberkulín vetus bovini, čistěný tuberkulín PPD připravený z kmene AN 5 v koncentraci 2 mg tuberkuloproteinu na 1 ml ředidla a čistěný tuberkulín z kmene humánního PN 14 se stejným množstvím tuberkuloproteinu jako u tuberkulínu připraveného z kmene AN 5. Tuberkulín vetus bovini 50% op. č. 93 použitý ve všech šesti skupinách obsahoval 90.000 tuberkulinových jednotek v 1 ml. Ve 2 mg tuberkuloproteinu připraveného z kmene AN 5 bylo zjištěno 600 000 tuberkulinových jednotek, ve 2 mg tuberkuloproteinu z kmene PN 14 bylo 300 000 tuberkulinových jednotek. Tuberkulín byl vytírován na skotu. Jako standardu k titraci uvedeného tuberkulínu bylo použito tuberkulínu vetus z Paul-Ehrlichova ústavu ve Frankfurtu nad Mohanem. Všechny tři druhy tuberkulínů byly inokulovány současně v množství 0,2 ml. Při použití 3 tuberkulínů byly vždy dva tuberkulíny inokulovány v rovině vertikální na předním okraji lopatky, třetí tuberkulín na protilehlé straně v dorzální části předního okraje lopatky. Při použití dvou tuberkulínů byly tuberkulíny inokulovány na protilehlých symetricky uložených místech v dorzální části předního okraje lopatky.

Ve druhé skupině skotu bylo použito tuberkulínu vetus 50% boviniho a čistěného tuberkulínu PPD připraveného z kmene PN 14, který rovněž obsahoval 2 mg tuberkuloproteinu na 1 ml ředidla.

Ve třetí skupině bylo použito téhož tuberkulínu vetus boviniho 50% jako u předcházejících zvířat. Čistěný tuberkulín připravený z kmene PN 14 však byl desetkrát zředěnější a obsahoval pouze 0,2 mg tuberkuloproteinu na 1 ml ředidla.

Abychom objasnili snižování a ovlivňování aktivity jednotlivých tuberkulínů vetus při současné aplikaci několika tuberkulínů jednomu zvířeti, provedli jsme u dalších tří skupin skotu srovnávací testy, při kterých jsme intradermálně inokulovali jednomu zvířeti na třech místech tuberkulínu vetus různé koncentrace. Přitom ve skupině IV. byl inokulován na dvou místech koncentrovaný tuberkulín vetus bovini 100%, op. č. 84 a na třetím místě byl aplikován srovnávací tuberkulín vetus bovini 50% op. č. 93.

Ve skupině V. byl použit srovnávací tuberkulín vetus 50% a 50% tuberkulín vetus bovini op. č. 84.

Ve skupině VI. byl současně inokulován srovnávací 50% tuberkulín vetus bovini (op. č. 93) a 10% tuberkulín vetus op. č. 84.

Způsob inokulace použitých tuberkulínů v jednotlivých skupinách je uveden na tabulce I.

Reakce byly odečítány za 72 hod. po intradermální inokulaci tuberkulínů kutimetrem zn. Prema.

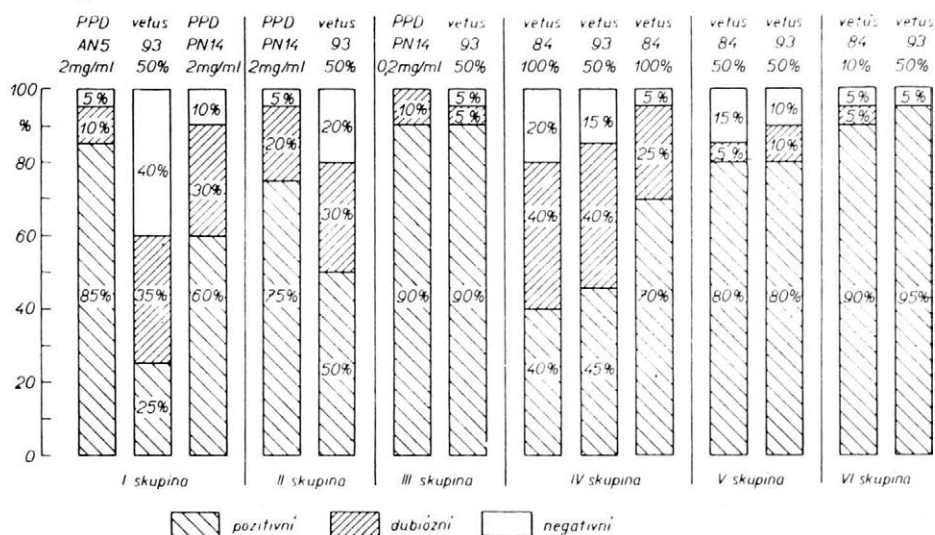
I. Aktivita tuberkulínů PPD a vetus při srovnávacích tuberkulinacích u skotu v hospodářství zamořeném tuberkulózou

I — dorsál. část předního okraje lopatky.
II — dorsál. část předního okraje lopatky } protilehlá
III — ventr. část před. okraje lopatky

Skupina zvířat		Stáří skotu	Počet vyšetř. zvířat	Počet vyšetř. zvířat celkem	Místo inokulace	Použitý tuberkulin	Průměrné reakční číslo u zvířat				Počet zvířat s reakčním číslem v mm			
							cel- kem	neg.	reagujících dub. poz.		0,1-1,5	1,6-2,5	2,6-3,5	> 3,6
I	A	> 2 roky	20	32	II	vetus.-bov. op. č. 93-50 %	2,49	0,99	2,40	4,98	8	5	2	5
					I	PPD-AN ₅ -2 mg/l ml	5,58	0,50	3,25	6,12	1	0	2	17
					III	PPD-PN 14-2 mg/l ml	4,70	0,50	2,90	6,30	2	1	5	12
	B	< 2 roků	12		II	vetus.-bov. op. č. 93-50 %	2,07	0,60	2,60	5,83	8	0	1	3
					I	PPD AN ₅ -2 mg/l ml	3,45	0,47	1,70	9,13	7	1	0	4
					III	PPD-PN 14-2 mg/l ml	3,12	0,71	1,80	7,40	6	2	0	4
II	A	> 2 roky	20	32	I	vetus.-bov. op. č. 93-50 %	3,85	1,00	2,66	5,71	4	2	4	10
					II	PPD-PN 14-2 mg/l ml	6,01	1,00	2,28	7,34	1	3	1	15
	B	< 2 roků	12		I	vetus.-bov. op. č. 93-50 %	2,23	0,70	1,80	6,10	7	2	0	3
					II	PPD - PN 14-2 mg/l ml	2,60	0,59	—	6,62	8	0	0	4
III	A	> 2 roky	20	32	I	vetus.-bov. op. č. 93-50%	6,86	0,8	3,5	7,39	1	0	1	18
					II	PPD-PN 14-0,2 mg/l ml	7,90	—	2,9	8,46	0	0	2	18
	B	< 2 roků	12		I	vetus bov.-op. č. 93-50%	2,53	0,75	1,7	5,85	7	1	0	4
					II	PPD PN 14-0,2 mg/l ml	2,73	0,68	—	6,78	8	0	0	4
IV	A	> 2 roky	20	32	I	vetus bov.-op. č. 93-50%	4,16	1,23	2,5	6,65	3	5	3	9
					II	vetus bov.-op. č. 84-100%	4,15	1,20	3,0	7,31	4	8	1	7
					III	vetus bov.-op. č. 84-100%	5,33	1,00	2,36	9,38	1	3	2	14
	B	< 2 roků	12		I	vetus bov.-op. č. 93-50%	4,21	0,55	2,03	8,44	4	2	1	5
					II	vetus bov.-op. č. 84-100%	4,15	0,90	2,00	7,03	4	2	/	6
					III	vetus bov.-op. č. 84-100%	5,11	0,60	2,27	10,40	4	2	1	5
V	A	> 2 roky	20	32	I	vetus bov.-op. č. 93-50%	7,50	1,15	1,80	9,00	2	2	—	16
					II	vetus bov.-op. č. 84-50%	7,36	1,10	2,30	8,85	3	1	—	16
	B	< 2 roků	12		I	vetus bov.-op. č. 93-50%	3,70	1,16	2,0	6,94	5	2	—	5
					II	vetus bov.-op. č. 84-50%	3,53	0,55	—	7,70	7	—	—	5
VI	A	> 2 roky	20	32	I	vetus op. č. 93-50%	7,50	—	1,7	7,80	—	1	—	19
					II	vetus bov. op. č. 84-10%	6,85	0,60	—	7,42	1	—	1	18
	B	< 2 roků	12		I	vetus bov. op. č. 93-50%	3,68	0,87	2,18	7,67	3	4	1	4
					II	vetus bov. op. č. 84-10%	2,61	0,46	2,30	5,53	5	2	1	4

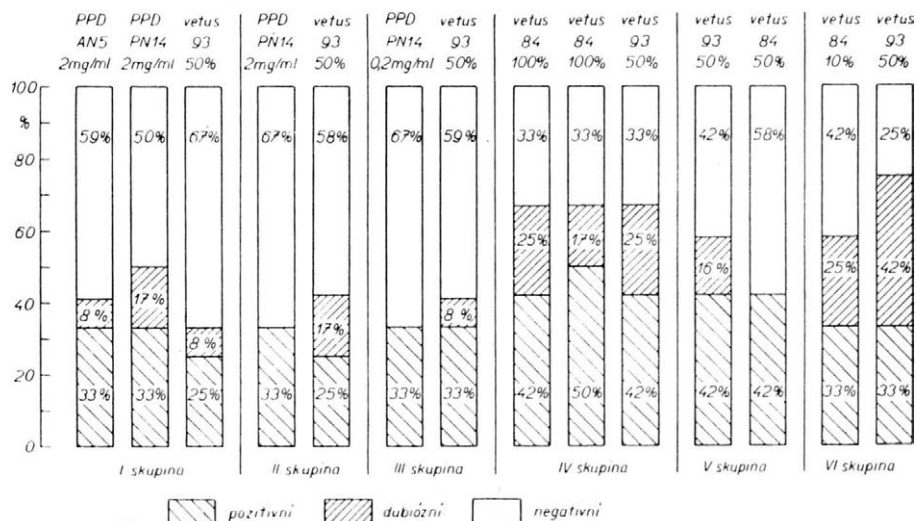
Výsledky pokusů

U skotu ve skupině I., kterému byl současně inokulován tuberkulín vetus 50%ní a čistěné tuberkuliny PPD, připravené z kmene AN5 a PN 14 s obsahem 2 mg tuberkuloproteinu na 1 ml ředidla, byl zjištěn značný rozdíl v aktivitě čistěných a vetus tuberkulínů, při čemž reakční čísla i počet pozitivních reakcí na PPD tuberkulín značně převyšoval počet pozitivních reagentů na tuberkulín vetus. Ve skupině dospělého skotu reagovalo na PPD tuberkulín z kmene AN5 85 % zvířat pozitivně, 10 % dubiózně, 5 % negativně. Na tuberkulín vetus op. č. 93 reagovalo pozitivně 25 % zvířat, 35 % dubiózně a 40 % negativně (graf 1 a 3, tabulka I).



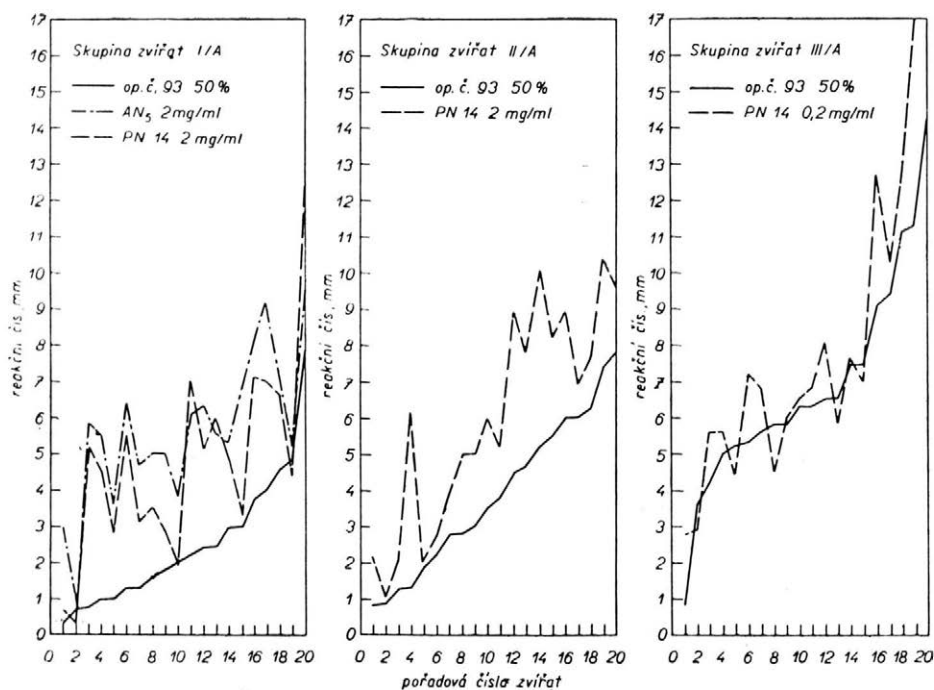
Graf 1.

Výsledek tuberkulinace u skotu dospělého (sk. A)

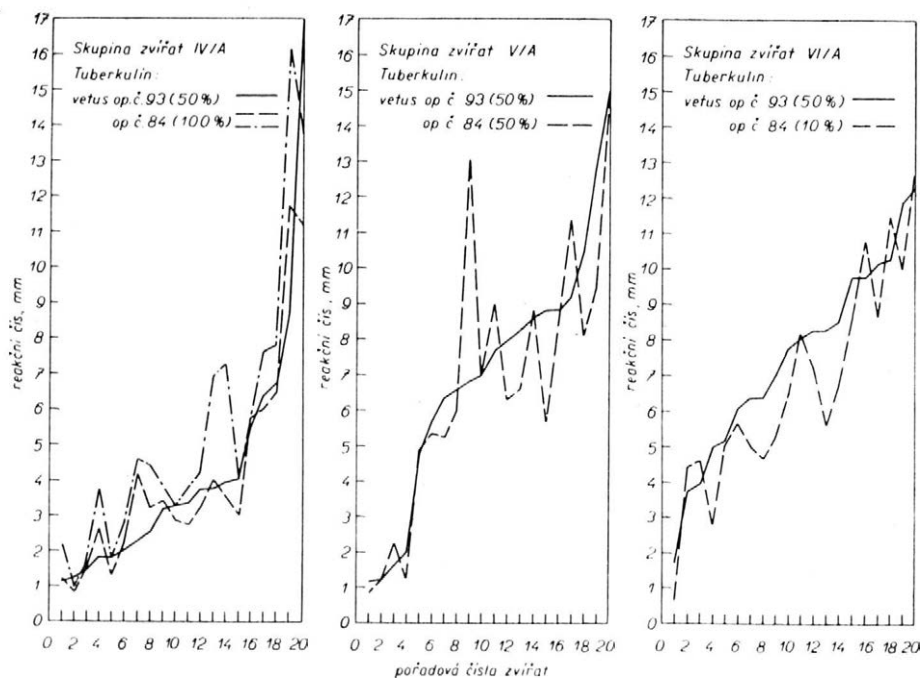


Graf 2.

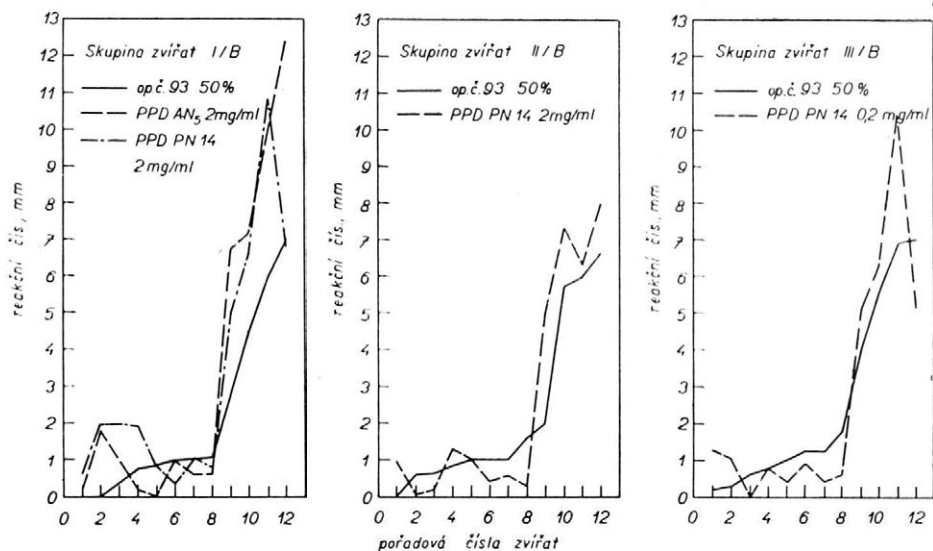
Výsledek tuberkulinace u mladého skotu (sk. B)



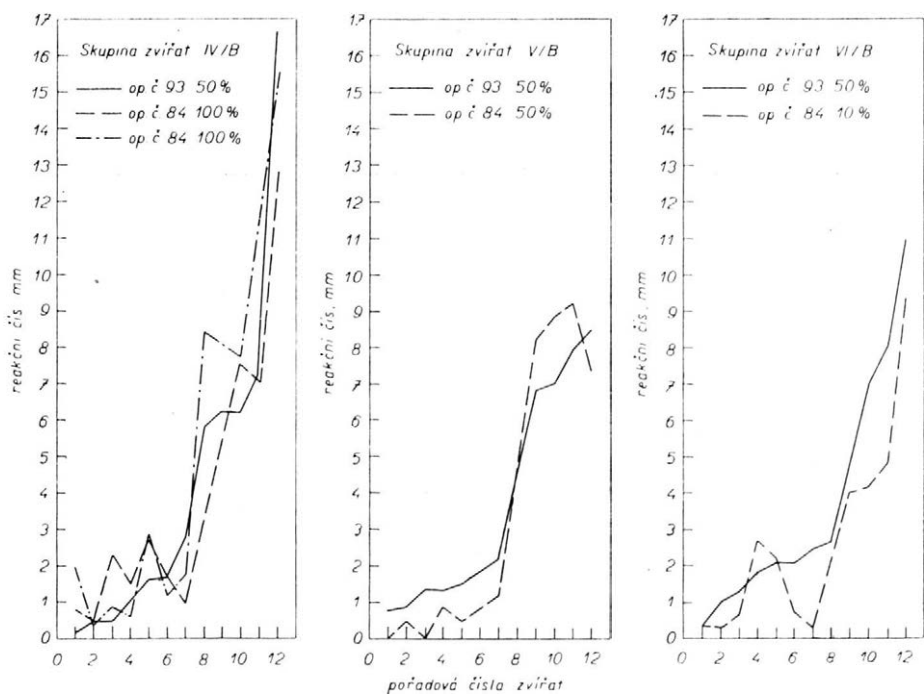
Graf 3.



Graf 4.



Graf 5.



Graf 6.

Značně menší rozdíly v počtu pozitivních reagentů mezi tuberkulinem PPD a vetus byly zjištěny u mladého skotu. Tak ze 12 vyšetřených zvířat reagovalo pozitivně na tuberkulín PPD z kmene AN5 33 % kusů, 8 % dubiózně, zatímco na tuberkulín vetus reagovalo pozitivně 25 %, dubiózně 8 % zvířat (graf č. 3 a 4).

Ve II. skupině zvířat, kde bylo použito tuberkulínu vetus 50%ního stejného op. č. jako u skupiny I. a tuberkulínu PPD připraveného z kmene PN 14 s obsahem 2 mg tuberkuloproteinu v 1 ml ředidla, byla zjištěna poněkud lepší spolehlivost tuberkulínu vetus ve srovnání s předcházející skupinou. Tak zatímco v I. skupině byl počet pozitivních reagentů na bovinní tuberkulín u dospělého skotu pouze 25 %, reagovalo ve II. skupině na tentýž tuberkulín 50 % zvířat pozitivně. Přitom i na PPD tuberkulín bylo dosaženo poněkud lepších výsledků než v I. skupině vzhledem k tomu, že počet pozitivních reakcí byl o 15 % větší (graf 1, tabulka I). U mladého skotu byl počet pozitivních reagentů na PPD tuberkulín z kmene PN 14 a vetus tuberkulín ve skupině I. a II. shodný (graf 2).

Z výsledků předcházejících srovnávacích tuberkulinací by mohl vyplynout závěr, že tuberkulín vetus má velmi nízkou aktivitu a nelze ho proto použít k diagnostice tuberkulózy. Další pokusy však tento názor vyvrátily.

Ve III. skupině zvířat, kde byl současně inokulován zředěný PPD tuberkulín s obsahem 0,2 mg tuberkuloproteinu na 1 ml ředidla a 50%ní tuberkulín vetus, bylo dosaženo výrazně lepších výsledků při hodnocení aktivity, a to zejména u tuberkulínu vetus. Z 20 kusů dospělého skotu reagovalo pozitivně na tuberkulín vetus 90 %, 5 % dubiálně a 5 % negativně. Na tuberkulín PPD z kmene PN 14 reagovalo rovněž 90 % zvířat pozitivně a 10 % dubiálně. To znamená, že počet pozitivních reagentů na tuberkulín vetus ve srovnání se skupinou I. se zvýšil o 65 %.

V další fázi pokusů jsme se snažili objasnit vzájemné ovlivnění tuberkulinových reakcí na tuberkulíny vetus při současné aplikaci jednomu zvířeti.

Ve IV. skupině byl na dvou místech inokulován intradermálně jednomu zvířeti tuberkulín vetus koncentrovaný 100 % a na třetím místě tuberkulín vetus 50 % op. č. 93. V další V. skupině skotu bylo použito 50 % tuberkulínu vetus op. č. 93 a op. č. 84, v poslední VI. skupině 10 % tuberkulín vetus op. č. 84 a 50 % tuberkulín op. č. 93.

Při hodnocení výsledků ve IV. skupině bylo zjištěno, že ze 20 kusů dospělého skotu reagovalo pozitivně na tuberkulín koncentrovaný (op. č. 84) 40 až 70 % zvířat. Na tuberkulín srovnávaný (op. č. 93) reagovalo pozitivně 45 % zvířat. Je pozoruhodné, že rozdíl v počtu pozitivních reagentů na koncentrovaný tuberkulín op. č. 84 byl poměrně značný a dosahoval u dospělého skotu 30 %. Tyto rozdílné výsledky mohly být vyvolány tím, že tuberkulín op. č. 93 a 84 byl inokulován společně na jedné straně zvířete, přičemž tuberkulín op. č. 84, na který bylo zjištěno 70 % pozitivních reakcí, byl aplikován ventrálně, kde je reaktivita kůže větší než v dorzální části předního okraje lopatky. Z tohoto výsledku vyplývá nutnost vhodné volby místa při srovnávací tuberkulinaci, zejména při titraci tuberkulinů. Při použití dvou tuberkulinů je proto nejlépe tuberkulín inokulovat vždy symetricky na protilehlých stranách zvířete.

V V. skupině, kde bylo použito 50%ního tuberkulínu op. č. 84 a 50%ního tuberkulínu vetus op. č. 3, bylo dosaženo značně lepších výsledků ve srovnání s předcházející skupinou. Při tom počet pozitivních reagentů na 50%ní tuberkulín op. č. 84 a 93 byl stejný — 80 % u dospělého skotu a 42 % u mladého skotu.

Nejlepších výsledků podle počtu pozitivních reagentů bylo dosaženo v VI. skupině, kde byl současně inokulován 10%ní tuberkulín op. č. 84 a 50%ní tuberkulín op. č. 93. Počet pozitivních reagentů na tuberkulín op. č. 93 u skupiny dospělého skotu byl 95 %. Zbytek 5 % zvířat reagovalo na uvedený tuberkulín dubiálně. Na 10%ní tuberkulín op. č. 84 reagovalo pozitivně 90 %, dubiálně 5 % a negativně 5 % kusů skotu.

Diskuse

Z uvedených výsledků vyplývá důležitý závěr zejména pro titraci a hodnocení aktivity tuberkulínů. Pokládáme za důležité zjištění, že při současné inokulaci dvou a více tuberkulínů s větším počtem TJ dochází ke značnému ovlivnění jejich aktivity. Přitom zejména se snižuje alergenní schopnost tuberkulínu s menším počtem TJ. Vliv koncentrace tuberkulínů na snížení aktivity vyplývá z obou částí pokusů, ve kterých bylo použito jednak tuberkulínů čistěných — PPD, jednak tuberkulínů vetus. U skupiny skotu, kterému byl současně inokulován tuberkulín čistěný a vetus tuberkulín, bylo zjištěno, že při současné aplikaci tří tuberkulínů, z nichž 2 byly čistěné, byl počet pozitivních reagentů na tuberkulín vetus 25%, tedy o 50 % nižší než na tuberkulín čistěný. Při současné inokulaci pouze 2 tuberkulínů se zvýšila aktivita tuberkulínu vetus na dvojnásobek, u čistěného tuberkulínu se zvýšil počet pozitivních reagentů o 15 %. Výrazně lepších výsledků bylo dosaženo při použití ředěného tuberkulínu čistěného (s 0,2 mg tuberkuloproteinu na 1 ml ředidla), kdy na čistěný tuberkulín reagovalo z 20 kusů dospělého skotu 18, tj. 90 %, na tuberkulín vetus rovněž 90 % kusů skotu.

Srovnáme-li zvířata pozitivně reagující v jednotlivých skupinách, zjišťujeme maximální počet pozitivních reagentů na tuberkulín op. č. 93 ve skupině skotu, kde bylo použito pouze 10% tuberkulínu vetus op. č. 84. Přitom na tuberkulín vetus op. č. 93 reagovalo 95 % zvířat pozitivně a 5 % dubiozně. Toto zjištění má značný význam nejen pro titraci a hodnocení aktivity, ale i pro diagnostiku tuberkulózy. Z uvedených výsledků vyplývá, že při titraci tuberkulínů nelze vyvozovat závěry o spolehlivosti tuberkulínů, jestliže bylo současně použito dvou nebo i více tuberkulínů o značně rozdílné aktivitě.

Uvedené výsledky potvrzují i údaje Beerwertha, Meyna, Schliessera, kteří rovněž zjistili, že při současné inokulaci tuberkulínů rozdílné koncentrace dochází k jejich vzájemnému ovlivnění. S údaji Beerwertha, který studoval optimální koncentraci TJ pro dosis na 575 kusech skotu s pozitivním pitevním nálezem a prokázal, že vysoké dávky tuberkuloproteinu snižují spolehlivost tuberkulinace, je možno i na podkladě našich výsledků částečně souhlasit, uvážíme-li, že při použití tuberkulínu PPD s 0,2 mg tuberkuloproteinu bylo dosaženo i v našich pokusech lepších výsledků, než při použití PPD tuberkulínu s 2 mg tuberkuloproteinu na 1 ml ředidla. K tomu je však nutno poznamenat, že snížení reakčních čísel a tím i počet pozitivních reagentů i na neředěné tuberkulíny je tím menší, čím více koncentrovaných tuberkulínů se inokuluje jednomu zvířeti současně. Je pozoruhodné, že těchto výsledků bylo dosaženo u dospělého skotu, zatím co u mladých zvířat nebylo zjištěno při aplikaci různě koncentrovaných tuberkulínů podstatných rozdílů.

Rozdílné výsledky v aktivitě čistěných tuberkulínů a vetus tuberkulínů u skupiny skotu dospělého a mladého s největší pravděpodobností souvisely s aktivitou tb procesu a dynamikou alergie po infekci.

U mladých zvířat s vyšší alergií na tuberkulín se zjistila poměrně výrazná reakce i na méně aktivní tuberkulín při současné aplikaci s aktivnějšími tuberkulíny čistěnými. Tato skutečnost vyplývá i z průměrných reakčních čísel na tuberkulíny vetus a PPD u skupiny dospělého a mladého skotu (tab. I).

Souhrn

V pokusech, ve kterých byla studována na 192 kusech skotu aktivita tuberkulínů PPD a vetus různé koncentrace a vzájemné ovlivnění výsledků tuberkulinace, bylo zjištěno:

1. Při současné intradermální inokulaci dvou tuberkulínů PPD se 2 mg tuberkuloproteinu a tuberkulínu vetus (s 90.000 TJ/1 ml) reagovalo ze 32 kusů skotu 25 % zvířat pozitivně na tuberkulín vetus. Na čistěný tuberkulín z kmene AN5 reagovalo pozitivně 65,7 % a na tuberkuloprotein z kmene PN 14 50 % zvířat pozitivně.

2. Při současné aplikaci pouze dvou tuberkulínů, a to tuberkuloproteinu PPD z kmene PN 14 s obsahem 2 mg tuberkuloproteinu v 1 ml ředidla a tu-

berkulínu vetus (90.000 TJ/1 ml) reagovalo na tuberkulín PPD 59,5 % a tuberkulín vetus 40,7 % zvířat pozitivně.

3. Značně lepších výsledků bylo dosaženo při použití ředěného PPD tuberkulínu s 0,2 mg tuberkuloproteinu/1 ml ředidla, kdy u skupiny dospělého skotu reagovalo 90 % pozitivně a 10 % dubiózně, zatímco na tuberkulín vetus reagovalo 90 % pozitivně, 5 % dubiózně a 5 % negativně.

4. Nejlepších výsledků, přihlížíme-li k počtu pozitivních reagentů, bylo při současné aplikaci dvou tuberkulínů dosaženo s tuberkulínem vetus (s obsahem 90.000 TJ/1 ml), na který reagovalo 95 % kusů skotu pozitivně a 5 % dubiózně. Rovněž na 10%ní tuberkulín vetus komerční reagovalo 90 % zvířat pozitivně a 5 % dubiózně.

5. Z uvedených výsledků vyplývá, že je možno dosáhnout poměrně velmi dobrých výsledků při diagnostice tbc skotu i při použití dostatečně aktivního tuberkulínu vetus v případě, že se současně neaplikují zvířatům jeden nebo i více tuberkulínů o větší aktivitě než tuberkulín hodnocený. Zároveň bylo prokázáno, že při současné aplikaci ředěných a neředěných tuberkulínů se značně snižuje tuberkulínová reakce a tím počet pozitivních reagentů na ředěný tuberkulín. Při současné aplikaci dvou i více neředěných tuberkulínů se současně snižují tuberkulínové reakce i na koncentrované tuberkulíny. Při titraci tuberkulínů není možno při současné aplikaci spolehlivě hodnotit aktivitu a diagnostickou spolehlivost současně aplikovaných koncentrovaných a ředěných tuberkulínů.

Došlo dne 20. 6. 1962

Literatura

1. Beerwerth W.: Die Anwendung verschieden stark konzentrierter Tuberkuline und ihre Auswirkung auf die intrakutane Tuberkulinreaktion beim Rinde. Monatshefte für Tierheilkunde, Sonderteil - Rindertuberkulose und Brucellose, Band 10, 1958, Jhr. 7, H. 12, 407. — 2. Meyn A.: Unspezifische Tuberkulinreaktionen beim Rinde. Wiener Tierärztliche Monatsschrift 48, 1961, 9, 46. — 3. Schliesser Th.: Mhfte für Tierheilkunde, Sonderteil Rindertuberkulose und Brucellose 6, 193, 1954. — 4. Meyer W.: Untersuchungen über den diagnostischen Wert verdünnter Tuberkuline. Monatshefte für Veterinärmedizin 24, 1961, 911. — 5. Kress F., Mathois H., Stöckel W.: Wiener Tierärztliche Wschr., 47, 500, 1960. — 6. Bederke G.: Mhfte Tierheilkunde, Sonderteil Rindertuberkulose und Brucellose 12, 173, 1960. — 7. Rossi L.: Sborník ČSAZV, Veterinární medicína 11, 877, 1961. — 8. Pavlas M.: Zpráva o studijní cestě do SSSR, Brno 1960. — 9. Ivanov M. M.: Biopreparaty, Virology, Mikrobiy, Tom VIII, Moskva 1959. — 10. Kirilov V. L.: Veterinarija 1960, 8, 46-48.

К вопросу оценки активности туберкулинов

В опытах, при которых у 192-х голов крупного рогатого скота изучалась активность туберкулинов ППД и vetus разной концентрации и взаимное влияние на результаты туберкулинизации, было установлено:

1. При одновременной интрадермальной инокуляции двух туберкулинов ППД с 2 мг туберкулопротеина и туберкулина vetus (с 90 000 TE/1 мл) — из 32-х голов крупного рогатого скота 25 % животных положительно реагировало на туберкулин vetus. На очищенный туберкулин из штамма АН5 положительно реагировало 65,7 % и на туберкулопротени из штамма ПН14 — 50 % животных.

2. При одновременном применении только двух туберкулинов, а именно туберкулопротеина ППД из штамма ПН 14 с содержанием 2 мг туберкулопротеина в 1 мл разбавителя и туберкулина vetus (90 000 TE/1 мл) на туберкулин ППД положительно реагировало 59,5 %, а на туберкулин vetus — 40,7 % животных.

3. Значительно лучшие результаты были достигнуты при применении разбавленного ППД туберкулина с 0,2 мг туберкулопротеина в 1 мл разбавителя, когда в группе взрослого крупного рогатого скота 90 % животных реагировало положительно и 10 % сомнительно, в то время как на туберкулин *vetus* 90 % реагировало положительно, 5 % сомнительно и 5 % отрицательно.

4. Самые лучшие результаты, принимая во внимание число положительно реагирующих животных, при одновременном применении двух туберкулинов были достигнуты с туберкулином *vetus* (с содержанием 90 000 ТЕ/1 мл), на который 95 % животных реагировало положительно и 5 % сомнительно. Также и на торговый 10%-ный туберкулин *vetus* 90 % животных реагировало положительно и 5 % сомнительно.

5. Из приведенных результатов вытекает, что можно достичь сравнительно очень хороших результатов при диагностике туберкулеза крупного рогатого скота даже при применении достаточного активного туберкулина *vetus* в том случае, если животным одновременно не дается один или более туберкулинов с большей активностью, чем оцениваемый туберкулин.

Наряду с этим было установлено, что при одновременном применении разбавленных и неразбавленных туберкулинов туберкулиновая реакция значительно снижается, а тем самым и число на разбавленный туберкулин положительно реагирующих животных.

При совместном применении двух и более неразбавленных туберкулинов одновременно снижаются туберкулиновые реакции и на концентрированные туберкулины.

При титровании туберкулинов нельзя при одновременном применении правильно оценить активность и диагностическую надежность совместно применяемых концентрированных и разбавленных туберкулинов.

Contribution à l'évaluation de l'activité des tuberculins

On a essayé sur 192 bovins l'activité des tuberculins PPD et *vetus* à différentes concentrations et l'influence mutuelle des différentes tuberculinisations, avec les résultats suivants:

1. Après l'inoculation intradermale simultanée avec 2 tuberculins, PPD, contenant 2 mg des tuberculoprotéines en 1 ml, et tuberculin *vetus*, avec 90.000 TU/1 ml, 25 % des 32 bovins réagissaient positivement sur tuberculin *vetus* purifié. Sur tuberculin purifié de la souche AN 5 65,7 % réagissaient positivement et sur le tuberculoprotéin de la souche PN 14 50 % des animaux réagissaient positivement.

2. Après l'inoculation simultanée des 2 tuberculins seuls, et cela du tuberculoprotéin PPD de la souche PN 14 et du tuberculin *vetus* avec 90.000 TU/1 ml, réagissaient 59,5 % des animaux sur PPD et 40,7 % sur tuberculine *vetus* positivement.

3. Des résultats considérablement meilleurs ont été atteints en usant le tuberculin PPD dilué avec 0,2 mg tuberculoprotéin/1 ml diluent, dont le groupe des bovins matures ont réagi 90 % positivement et 10 % dubitativement, tandis que sur tuberculin *vetus* les réactions ont été 90 % positives, 5 % dubitatives et 5 % négatives.

4. Le plus grand nombre des réactions positives a donné l'application simultanée de 2 tuberculins avec tuberculins *vetus* (90.000 TU/1 ml), où 95 % des bovins réagissaient positivement et 5 % dubitativement. Aussi sur le tuberculin *vetus* commercial à dilution de 10 % les réactions des animaux ont été de 90 % positives et 5 % dubitatives.

5. Il en résulte, qu'il est possible d'atteindre des résultats relativement bons dans le diagnostic de la tuberculose du bétail aussi en usant un tuberculin suffisamment actif en cas, qu'on n'applique aux animaux simultanément un ou plusieurs tuberculins d'activité supérieure que le tuberculin évalué.

En même temps on a prouvé, que pendant l'application simultanée des tuberculins dilués et non dilués la réaction sur le tuberculin diminue considérablement et avec cela le nombre des réagissants positivement au tuberculin dilué. Après l'application simultanée de deux et plusieurs tuberculins non dilués se diminuent en même temps les réactions sur le tuberculin même sur les tuberculins concentrés. Le titration des tuberculins ne donne pas la possibilité pendant une application simultanée d'évaluer proprement l'activité et la valeur diagnostique des tuberculins concentrés et dilués, appliqués simultanément.

Studie aktivity monovalentních, bivalentních a komplexních tuberkulínů (tuberkuloproteinů)

Изучение активности одновалентных, двухвалентных и комплексных туберкулинов
(туберкулопротеинов)

Die Aktivität monovalenter, bivalenter und komplexer Tuberkuline
(Tuberkuloproteine)

Essay on the activity of monovalent and bivalent human and complex tuberculin
(tuberculo-proteins)

MVDr. Leopold ROSSI, MVDr. Slavomír DOKOUPIL

Výzkumný ústav veterinárního lékařství v Brně, ředitel doc. MVDr. J. Vlček

Úvod

Otázka výroby vysoce aktivních a k diagnostice nejvhodnějších tuberkulínů není dosud zcela uspokojivě vyřešena.

V různých státech jsou používány k výrobě buď pouze kmeny mykobakterií typu bovinního (např. Dánsko, SSSR), nebo pouze kmeny *M. tuberculosis* (Polsko) a konečně kombinace kmenů *M. bovis* a *M. tuberculosis* (NDR).

Všichni výrobci směřují k jedinému cíli — vyrobit takový alergen, kterým by bylo možno odhalit největší počet nakažených zvířat.

V naší práci jsme se snažili stanovit aktivitu monovalentních tuberkulínů vyráběných z kmenů bovinních, aviárních, humánních, dále smíšených tuberkulínů (PPD) vyráběných z kmenů *M. bovis* a *M. tuberculosis* a konečně komplexních tuberkuloproteinů získaných z SSSR a vlastní výroby.

Literatura

Podle literárních údajů doporučuje J u s k o v e c (1953) výrobu tuberkulínů pouze z bovinních kmenů, Brill a Politynska (1960) používají při výrobě čistěných tuberkulínů pouze humánních kmenů. Plum (1957) referoval o aktivitě a specifitě tuberkulínů vyrobených pouze z kmenů bovinních, přičemž zvláště zdůrazňoval jejich vysokou specifitu. Stejně tak rumunští pracovníci vyrábějí tuberkulíny z bovinních kmenů. Rovněž v NSR Nicolaus a Michael (1961) prosazují na základě svých dlouholetých studií používání monovalentních tuberkulínů a vzniká dojem, že se tam prosazuje názor Plumův, aby se vyráběly tuberkulíny z autogenních kmenů vypěstovaných z tbc materiálu tuzemského skotu. Naproti tomu v NDR zejména v Dessau se zaměřují na výrobu bivalentních tuberkulínů, neboť dosahují vysoké výtěžnosti a tím vysokých ekonomických výhod při výrobě savčích tuberkulínů vyrobených z kultur *M. tuberculosis* kmene PN 14 a *bovis* kmene bovinního AN 5.

I. Použité tuberkulíny a počet vyšetřeného skotu

Pokus číslo	Počet vyšetřeného skotu	Druh použitého tuberkulínu	Dávka tuberkulínu	Průměrné reakční číslo v mm za 72 hod.	Počet zvířat reagujících		
					+	±	—
I	45 (24 + 21)	Koch vet. tuberk. boviní 50 %	0,2 ml	5,45	30 66,66%	11 24,34%	5 9%
		Koch vet. tuberk. humánní 50 %	0,2 ml	5,25	27 60%	9 20%	9 20%
II	20	Koch vet. tuberk. boviní 50 %	0,2 ml	3,83	12 60%	5 25%	3 15%
		AN5 boviní tuberkulo-protein	0,2 ml 0,2 mg	7,6	12 60%	6 30%	2 10%
		PN14 humánní tuberkuloprotein	0,2 ml 2,0 mg	2,98	6 30%	4 20%	10 50%
III	64	AN5 boviní tuberkuloprotein	0,2 ml 0,1 mg	7,8	46 72%	15 23,4%	3 4,6%
		PN14 humánní tuberkuloprotein	0,2 ml 0,1 mg	8,2	47 73,4%	15 23,4%	2 3,2%
IV	40	AN5 boviní tuberkuloprotein	0,2 ml 0,2 mg	5,2	33 82,5%	5 12,5%	2 5%
		PN14 humánní tuberkuloprotein	0,2 ml 0,2 mg	7,0	32 80%	5 12,5%	3 7,5%
		Koch vetus boviní 50 %	0,2 ml	4,7	18 45%	15 37,50%	7 17,50%
		Koch vetus humánní 50 %	0,2 ml	3,6	16 40%	13 32,5%	11 27,5%
V a	20	AN5 boviní tuberkuloprotein	0,2 ml 0,1 mg	6,55	18 90%	2 10%	
			0,2 ml 0,05 mg	7,1	19 95%	1 5%	
			0,2 ml 0,02 mg	6,0	18 90%	2 10%	

Pokračování tabulky č. I

V a	20	PN14 humánní tuberkuloprotein	0,2 ml 0,1 mg	6,0	18 90%	2 10%	
			0,2 ml 0,05 mg	6,8	19 95%	1 5%	
			0,2 ml 0,02 mg	5,2	16 80%	2 10%	2 10%
V b	20	AN5 boviní tuberkuloprotein	0,2 ml 0,1 mg	6,1	16 80%	2 10%	2 10%
			0,2 ml 0,05 mg	4,6	13 65%	4 20%	3 15%
			0,2 ml 0,02 mg	4,7	14 70%	3 15%	3 15%
V _b		AN5 a PN14 směs	0,2 ml 0,1 mg	6,1	17 85%	—	3 15%
			0,2 ml 0,05 mg	6,5	17 85%	2 10%	1 5%
			0,2 ml 0,02 mg	6,04	14 70%	4 20%	2 10%
V c	20	PN14 humánní tuberkuloprotein	0,2 ml 0,1 mg	4,1	16 80%	3 15%	1 5%
			0,2 ml 0,05 mg	5,2	14 70%	2 10%	4 20%
			0,2 ml 0,02 mg	5,07	15 75%	4 20%	1 5%
		AN5 a PN14 směs	0,2 ml 0,1 mg	7,1	19 95%	1 5%	—
			0,2 ml 0,05 mg	7,1	18 90%	2 10%	—
			0,2 ml 0,02 mg	6,2	19 95%	1 5%	—

II. Výsledky po tuberkulinaci komplexním tuberkulínem

Pokus číslo	Počet vy- šetřeného skotu	Druh použitého tuberkulínu	Dávka tuberkulínu	Průměrné reakční číslo za 72 hod.	Počet zvířat reagujících		
					+	±	—
VI (1)	133	Koch vetus Ivanovice b. 50 %	0,2 mm				133
		Koch vetus aviární 50 %	0,2 mm	4,8	7 (4,9%)	—	126
		PPD komplexní — SSSR	0,2 mm	6,1	7 (4,9%)	—	126 (95,1%)
		PPD boviní SSSR	0,2 mm Tj 10.000	—	—	—	133 (100%)
		PPD boviní ČSSR	0,2 mm 0,2 mg	—	—	—	133 (100%)
VI (2)	50		0,2 mm	—	—	—	
		Koch vetus Ivanovice b. 50 %					50 (100%)
		Koch vetus aviární 50 %	0,2 mm	—	—	—	50 (100%)
		PPD komplexní SSSR	0,2 mm	3,0	19 (38%)	4 (8%)	27 (56%)
		Bovini PPD SSSR	0,2 mm	—	—	—	50 (100%)
VII (3)	78	Bovini PPD ČSSR	0,2 mm (0,2 mg)	—	—	—	50 (100%)
		Koch vetus Ivanovice b. 50 %	0,2 mm	2,3	22 (30%)	21 (29%)	35 (41%)
		PPD humánní	0,2 mm Tj 10.000	4,2	56 (72%)	17 (22%)	5 (6%)
		PPD boviní ČSSR	0,2 mm (0,2 mg)	5,5	52 (66%)	20 (27%)	6 (7%)
		PPD komplexní SSSR	0,2 mm	4,0	46 (59%)	21 (29%)	11 (22%)
VIII (4)	39	Koch vetus Ivanovice b. 50 %	0,2 mm	2,7	13 (33%)	8 (20%)	18 (47%)
		PPD humánní	0,2 mm Tj 10.000	5,7	29 (74%)	7 (17%)	3 (9%)
		PPD komplexní SSSR	0,2 mm	7,0	31 (79%)	5 (12%)	3 (9%)
IX (5)	84	Koch vetus Ivanovice b. 50 %	0,2 mm	5,9	66 (78,6%)	18 (19,1%)	—
		Koch vetus komplexní 50 %	0,2 mm	8,0	77 (92,8%)	7 (7,2%)	—
		Koch vetus aviární 50 %	0,2 mm	více než 3,6	20 (23%)	23 (26%)	—

Manninger (1960) zdůrazňuje, že k zjišťování tuberkulózní infekce skotu se může stejně dobře používat tuberkulín připravený jak z mykobakterií boviních, tak humánních, tedy savčí tuberkulín. Účinnost obou těchto tuberkulínů je totiž stejná, mají-li stejný titr, poněvadž oba typy tbc zárodků mají stejnou antigenní strukturu.

Baisden, Larsen, Vardaman (1952) referují o práci, která se zabývala studiem specifity tuberkulinu boviního (kanadský) a humánního (BAI). Pomocí boviního tuberkulinu se mohla přesněji rozlišovat infekce boviní od infekce aviární a paratuberkulózy, než když použili humánního tuberkulinu. Potence boviního tuberkulinu však nebyla tak vysoká. Dále bylo zjištěno, že purifikovaný proteinový derivát (PPD) připravený z obou typů má stejnou specifitu.

Třetí skupina pracovníků, mezi nimi Kirilov (1960), doporučuje ještě výrobu komplexních tuberkulínů a soudí na základě provedených pokusů, že komplexní purifikovaný tuberkulín je možno úspěšně používat k diagnostice tuberkulózy drůbeže. Ve všech chovech, kde byl tento preparát použit u skotu a drůbeže, byla zjištěna zvířata nakažená tuberkulózou v mnohem větším počtu případů, než při použití obyčejných tuberkulínů.

Metodika práce

Naše pokusy jsme zaměřili k zjištění aktivity monovalentních boviních a humánních tuberkulínů, bivalentních tuberkulínů (boviního a humánního) a komplexních tuberkulínů ve srovnávacích intrakutánních tuberkulinacích u skotu spontánně infikovaného *M. bovis*.

Monovalentní a bivalentní tuberkulíny byly vyrobeny buď jako Koch vetus tuberkulíny nebo jako purifikované proteinové deriváty vyrobené z kmene boviního AN 5 a z humánního kmene PN 14. Bivalentní purifikovaný proteinový derivát byl vyroben z 2 dílů boviního kmene AN 5 a 1 dílu humánního kmene PN 14.

Komplexní tuberkulín (SSSR) byl injikován jako směs Koch vetus tuberkulinu savčího 2 díly a 1 díl aviárního v dávkách 0,2 ml jako komplexní tuberkuloprotein z SSSR. Druh tuberkulínů, způsob jejich aplikace a počet zvířat je uveden v tabulce I a II.

Vlastní práce

I.

V prvním zemědělském závodě byla zjištěna alergenní účinnost Koch vetus tuberkulínů op. č. 81 a 82 u humánního Koch vetus tuberkulinu H₂ u 24 kusů skotu nakaženého *M. bovis*.

Pozitivně reagovalo na tuberkulíny (č. 81 a 82) 79 % a 83 % zvířat, kdežto na humánní tuberkulín 71 % při průměrných reakčních číslech 5,2 a 4,9 proti 4 mm po humánním tuberkulinu.

Pokusné vyhodnocení dopadlo nepříznivě pro humánní tuberkulín monovalentní, neboť jím bylo odhaleno o 12 % a o 8 % méně reagentů při nižším reakčním čísle o 0,9 a 1,2 mm.

V druhém zemědělském závodě při vyšetření 21 kusů skotu reagovalo pozitivně a dubiózně na tuberkulín boviní 100 % zvířat při průměrném reakčním čísle 6,27 mm proti 90,90 % při reakčním čísle 6,50 mm po humánním tuberkulinu.

Také toho vyhodnocení dopadlo tedy nepříznivě pro humánní tuberkulín, neboť bylo zjištěno o 9,1 % méně reagentů než po boviním tuberkulinu (tab. I–I).

II.

Ve třetím zemědělském závodě byl srovnáván Koch vetus boviní tuberkulín s humánním a boviním tuberkuloproteinem u 20 kusů skotu. Nejvíce reagentů

— 90 % — bylo zjištěno po boviním AN5 tuberkuloproteinu a o 40 % méně po humánním PN14 tuberkuloproteinu proti 85 % po Koch vetus boviním tuberkulinu (50 %). Nejvyšší reakční číslo po boviním PPD tuberkulinu činilo 8,45 mm proti 5,96 mm po humánním PPD a 4,7 mm po boviním Koch vetus tuberkulinu (tab. I—II).

III.

Ve čtvrtém pokusu byl v akutně zamořeném chovu (64) infikován AN5 a PN 14 tuberkuloprotein každý na jedné straně v dávce 0,1 mg v 0,2 ml. Po humánním tuberkuloproteinu bylo zjištěno poněkud vyšší průměrné reakční číslo 8,2 mm proti 7,8 mm a rovněž reagentů o 1,4 % více (96,8—95,4 %) (tab. I—III).

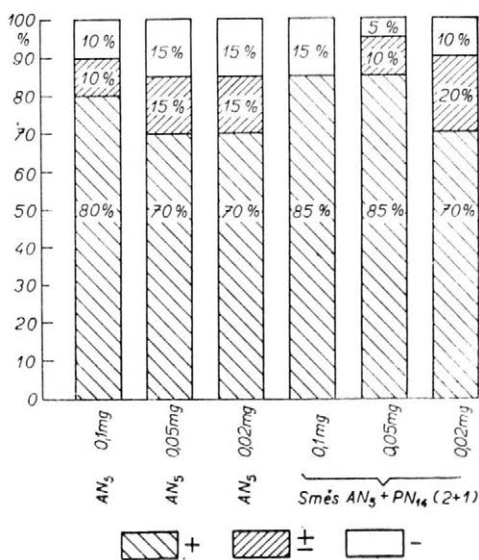
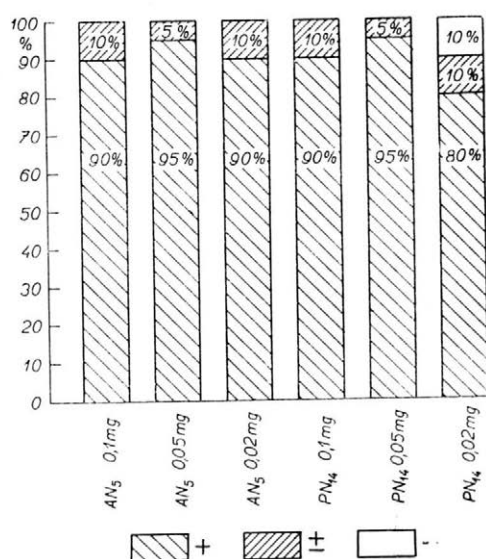
IV.

Pátý pokus byl proveden tak, že se 40 kusům skotu tbc tuberkulíny Koch injikovaly na jednu stranu a čistěné tuberkuloproteiny AN5 a PN14 na druhou stranu.

Průměrné reakční číslo po boviním tuberkuloproteinu činilo 5,2 mm a po humánním tuberkuloproteinu 7 mm. V tomto pokuse bylo sice průměrné reakční číslo vyšší po humánním tuberkuloproteinu o 1,8 mm, avšak reagentů bylo více po boviním tuberkuloproteinu o 2,5 % (95,0 % proti 92,5 %) (tab. I—IV).

Výsledky po Koch vetus tuberkulínech byly v tomto pokuse velmi nepříznivé neboť reakce byly pouze u 45 % a 40 % zvířat pozitivní. Nelze vyloučit vliv vyšší potence tuberkuloproteinu (B e e r w e r t h) na průběh alergie po slabším tuberkulinu.

Srovnávací tuberkulinace RN5 a PN14 tuberkulinů PPD



Graf č. 1. Grafické znázornění titrace tuberkuloproteinů AN₅ (boviního) a PN₁₄ (humánního)

Graf č. 2. Grafické znázornění titrace ředěných tuberkulinů AN₅ a AN₅ + PN₁₄ (2+1)

V.

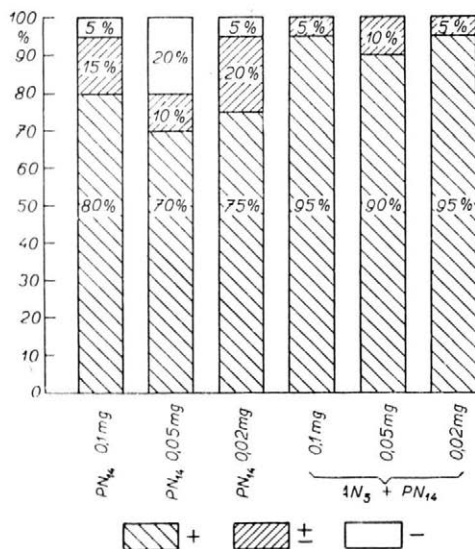
Další studie byla srovnávací tuberkulinace boviním (AN5) a humánním tuberkuloproteinem PN14 a dále AN5 a směsí AN5 (2 díly) a PN14 (1 díl).

V prvním pokuse bylo 20 tbc kravám injikováno (AN5) boviního tuberkuloproteinu a (NP14) humánního tuberkuloproteinu 0,1, 0,05, a 0,02 mg v 0,2 ml a byla zjištěna menší reakční čísla po humánním tuberkuloproteinu (PN14) — 6,0 — 6,8 a 5,2 mm proti 6,55 — 7,1 a 6,0 mm AN5 za 72 hod. při něco nižší diagnostické účinnosti po dávce 0,02 mg PN14. (Tab. I—Va — graf I.) V srovnávacím pokuse (20 kusů skotu) AN5 a AN5 a PN14 byla vyšší reakční čísla po smíšeném tuberkuloproteinu v dávkách 0,05 a 0,02 mg při něco vyšší diagnostické spolehlivosti (graf 2) (tab. I—Vb).

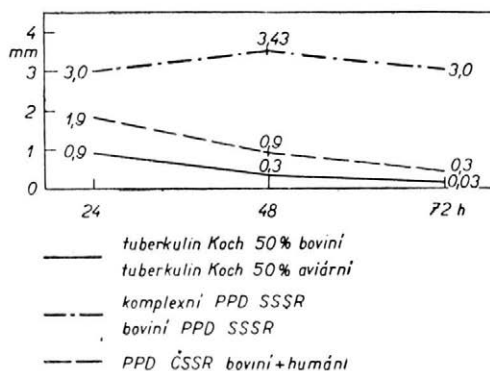
Při druhé srovnávací tuberkulinaci rovněž provedené u 20 kusů skotu PN14 se směsí AN5 a PN14 bylo zjištěno větší průměrné reakční číslo po smíšeném tuberkuloproteinu 7,1 — 7,1 — 6,2 mm proti 5,2 — 5,07 — 4,1 mm po monovalentním PN14 humánním tuberkuloproteinu a také vyšší počet pozitivních reagentů 95, 90, 95 proti 80, 70, 75 % (graf 3) (tab. I—Vc).

Výsledky pokusů uvedených v I., II., III., IV a V. dokazují, že u skotu infikovaného *M. bovis* se zjišťuje po monovalentních boviních tuberkulínech (tuberkuloproteinech) více tbc infikovaného skotu.

V pokuse V. výsledky prokazují poněkud vyšší aktivitu smíšeného tuberkuloproteinu boviního AN5 (2 díly) a PN14 humánního (1 díl).



Graf č. 3. Grafické znázornění titrace tuberkuloprotein PN₁₄ (humánního) a AN₅ (boviního) a PN₁₄ (2+1)



Graf č. 4. Výsledek intrakutánní tuberkulinace u skotu negativně reagujícího (prosté tuberkulózy)

Alergenní účinnost komplexního tuberkulinu (tuberkuloproteinu)

VI.

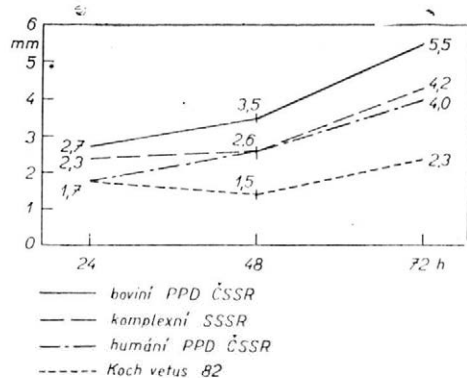
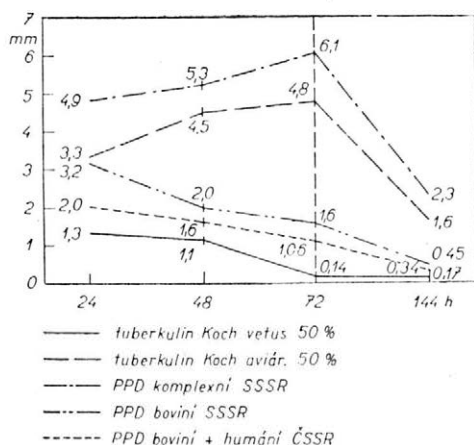
Studie směřovala k zjištění diagnostické upotřebitelnosti komplexního tuberkuloproteinu vyrobeného z kultur *M. bovis* z *M. tuberculosis* a *M. avium*. U skotu negativně reagujícího (50) na boviní a aviární tuberkulin jsme zjistili nepra-

videlnost průběhu reakce po komplexním tuberkuloproteinu. Průměrné reakční číslo činilo od 24 hodin 3 mm, za 48 hodin 3,43 mm a za 72 hodiny 3 mm při pozitivních reakcích v 38 % (graf 4, tabulka II).

U skotu kladně reagujícího (7) na aviární Koch vetus tuberkulín byly reakce po komplexním tuberkuloproteinu výraznější. Průměrné reakční číslo činilo 4,9–5,3 a 6,1 mm, kdežto Koch vetus tuberkulín 3,3–4,5 a 4,8 mm (graf 5). Tyto práce byly uskutečněny v chovu skotu prostého tbc, avšak s občasným výskytem kladných reakcí po aviárním Koch vetus tuberkulínu. Celkový počet vyšetřeného skotu činil 183 kusy.

VII.

V jiném zemědělském závodě byla ještě prověřována účinnost komplexního tuberkuloproteinu proti současně injikovaným tuberkulínům Koch vetus, humánním PPD a boviním ČSSR u 78 kusů skotu nakaženého *M. bovis*. Nejvyšší průměr v reakčních číslech 5,5 mm při 93 % diagnostické spolehlivosti byl shledán po boviním PPD tuberkuloproteinu SSSR a 94 % po humánním tuberkuloproteinu a pouze 59 % po Koch vetus tuberkulínu — Ivanovice na Hané (graf 6, tabulka II).



Graf č. 5. Průběh tuberkulinace na vetus PPD a komplexní tuberkulín u skotu nakaženého aviární tuberkulózou

Graf č. 6. Srovnávací tuberkulinace tuberkulínů Koch vetus, humánního a boviního PPD a komplexního u skotu nakaženého boviním typem *M. tbc*.

VIII.

Dále byl zkoušen komplexní tuberkuloprotein SSSR u 39 kusů skotu infikovaného *M. bovis* srovnávací intrakutánní tuberkulinací s Koch vetus tuberkulínem a humánním tuberkulínem PPD — ČSSR (graf č. 7).

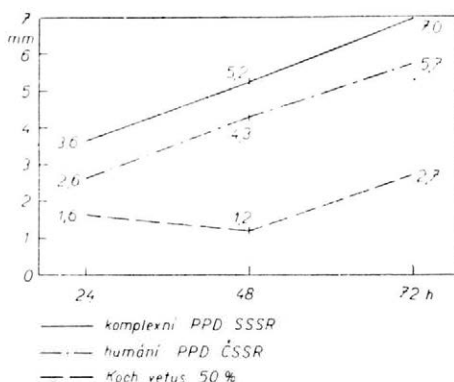
91procentní diagnostická jistota byla shledána jak po komplexním, tak po humánním tuberkuloproteinu proti nepoměrně menšímu odhalení tbc infikovaného skotu Koch vetus tuberkulínem v 53 %.

IX.

V posledním pokuse byla u 84 kusů skotu nakaženého *M. bovis* srovnávána účinnost Koch vetus boviního tuberkulínu, komplexního Koch vetus tu-

berkulínu (2 díly savčího a 1 díl aviárního) a aviárního 50% Koch vetus tuberkulínu.

Po komplexním tuberkulínu bylo zjištěno 92,8 % pozitivních reagentů při 7,2 % dubiózních reakcí a při průměrném reakčním čísle 8 mm, po boviním Koch vetus tuberkulínu bylo pozitivních reakcí 78,6 %, při 19,1 % dubiózních reagentů a průměrném reakčním čísle 5,9 mm a po Koch vetus aviárním tuberkulínu 23 % pozitivních reakcí nad 3,6 mm a 26 % reakcí do 3,6 mm.



Graf č. 7. Srovnávací tuberkulinace Koch vetus, humánního a boviního PPD a komplexního

Diskuse

Otázka výběru kmenů k výrobě alergenů (tuberkulínů-tuberkuloproteinů) je často diskutována. V první části práce byla srovnávána diagnostická spolehlivost tuberkulínů (tuberkuloproteinů) monovalentních a humánních, dále bivalentních alergenů boviních a humánních.

Účinnost tuberkulínů (tuberkuloproteinů) monovalentních boviních byla lepší proti humánním ve většině pokusů. Pouze v jediném u 64 kusů skotu byla shledána vyšší diagnostická spolehlivost po humánním tuberkuloproteinu o 1,4 % (96,8 % proti 95,4 %).

Lze souhlasit s Nicolausem a Michaelem, kteří tvrdí, že tuberkulín vyrobený jako monovalentní boviní k diagnostice tbc skotu dává vyhovující diagnostické výsledky. Avšak rovněž tuberkulín vyrobený z *M. tuberculosis* má dobré vlastnosti alergenní. Při stejném titru není též podle Manningera námitek proti používání tohoto tuberkulínu v diagnostice tbc skotu, neboť oba tyto typy mykobakterií mají stejnou antigenní strukturu.

Zvláště dobré alergenní vlastnosti byly zjištěny u smíšeného tuberkuloproteinu boviního 2 díly a humánního tuberkuloproteinu 1 díl. Výsledky se shodují s výsledky Baisdena, Larsena a Vardamana. Zejména v době, kdy klesá alergenní účinnost tuberkulínu nebo se mění alergenní vlastnosti výrobních kmenů, jsou hledány možnosti úpravy monovalentního biopreparátu pro veterinární účely vyrobeného z kmene *M. bovis*.

V druhé části práce byla zjišťována alergenní účinnost komplexního tuberkuloproteinu vyrobeného v SSSR a zejména Kirilovem doporučeného k diagnostice tbc hospodářských zvířat, tedy boviní a aviární tbc.

Skutečně také byl biopreparát vyrobený jako Koch vetus používán k diagnostice tbc skotu a jak i dosažené výsledky v této práci dokazují, dává dobré diagnostické výsledky i při diagnostice aviární infekce.

U skotu nereagujícího na boviní ani aviární tuberkulín však vyvolal komplexní tuberkuloprotein nespecifické reakce dosahující výši v průměru 3 mm za 72 hod. Z toho důvodu nelze doporučit prozatím komplexní tuberkuloprotein zejména k simultánní tuberkulinaci.

Otázka použití komplexního tuberkuloproteinu bude předmětem dalších studií.

Souhrn

U 299 kusů skotů nakaženého *M. bovis* byla zjišťována alergenní účinnost tuberkulínů (tuberkuloproteinů) monovalentních boviních a humánních, bivalentních a komplexních.

1. Srovnávací tuberkulinace prokázaly většinou vyšší diagnostickou spolehlivost boviních proti humánním tuberkulínům (tuberkuloproteinům).

2. Bivalentní tuberkuloprotein (boviní AN5 2 díly a humánní PN14 1 díl) prokázal vyšší aktivitu než monovalentní tuberkuloproteiny.

3. Alergenní účinnost komplexního sovětského tuberkuloproteinu byla sledována v zemědělském závodě nakaženém *M. avium* (183 kusů skotu) a ve 3 chovech (201 kusů skotu) zamořených *M. bovis* srovnávací tuberkulinací s monovalentními tuberkulíny (tuberkuloproteiny).

Výsledky pokusů prokázaly, že lze komplexního tuberkuloproteinu použít k diagnostice tbc skotu a u skotu infikovaného *M. avium* byly zjištěny větší reakce než po Koch vetus aviárním 50% tuberkulinu.

U skotu negativního na tuberkulín boviní a aviární vyvolal komplexní tuberkulín nespecifické reakce ve výši 3 mm od 24–72 hodin.

Literatura

1. Baisden L. A., Larsen A. B., Vardaman T. H. (1952): Amer. J. Vet. Res. XIII, 46:338-344. — 2. Dražan a kolektiv: Státní zemědělské nakladatelství Praha, 1962. Tbc hospodářských zvířat. — 3. Brill J., Politynska E.: Panstwowe Wydawnictwo Rolnicze i Lesne, Tuberkulina PPD - Warszawa 1960. — 4. Freerksen E., Lauterbach B.: Zbl. Bakt. I orig. 121, 1960. — 5. Kirilov L. V.: Veterinarija 8, 46-48, 1960. — 6. Manninger R.: Magyar Allatorvosok lapja 14, 3, 79, 83, 1959. — 7. Manninger R.: Magyar Allatorvosok lapja 6, 206-210, 1960. — 8. Michael, Nicolaus: Mh. Tierhkl. Rindertbc, 1, 1961. — 9. Pavlas M.: Zpráva ze studijní cesty - NDR - 1960. — 10. Plum N.: Veterinářství 1958. — 11. Plum N.: Tuberculin en médecine vétérinaire. Section de la standardisation immunomicrobiologique 1955. — 12. Rossi L.: Sborník ČSAZV - Veterinární medicína 7-9, 637, 1959. — 13. Seibert Fl.: Amer. Rev. tuberc. 69/4, 585-94, 1954-71/4, 704-21, 1955.

Изучение активности одновалентных, двухвалентных и комплексных туберкулинов (туберкулопротенинов)

У 299 голов крупного рогатого скота, зараженного *M. bovis*, определялась аллергическая эффективность туберкулинов (туберкулопротенинов) одновалентных бычьих и человеческих, двухвалентных и комплексных.

1. Сравнительная туберкулинизация свидетельствовала и преимущественно более высокой диагностической надежности бычьих туберкулинов по сравнению с человеческими (туберкулопротенинами).

2. Двухвалентный туберкулопротеин (бычий AN5-2 доли и человеческий PN 14-1 доля) доказал более высокую активность, чем одновалентные туберкулопротеины.

3. Аллергенная эффективность комплексного советского туберкулопротеина изучалась в сельскохозяйственном предприятии, зараженном *M. avium* (183 головы крупного рогатого скота), и в 3-х стадах (201 голова скота), зараженных *M. bovis*, путем сравнительной туберкулинизации с одновалентными туберкулинами (туберкулопротеинами).

Результаты опытов доказали, что комплексный туберкулопротеин можно использовать для диагностики туберкулеза крупного рогатого скота, а у скота, инфицированного *M. avium*, были установлены большие реакции, чем после применения вакцины *Kox vetus* птичьей 50 % туберкулина.

У крупного рогатого скота, отрицательно реагирующего на бычий и птичий туберкулин, комплексный туберкулин вызвал неспецифические реакции в пределах 3 мм после 24—72 часов.

Die Aktivität monovalenter, bivalenter und komplexer Tuberkuline (Tuberkuloproteine)

An 229 mit *M. t. bovis* angesteckten Rindern wurde die allergene Wirksamkeit der monovalenten bovinen und humanen, der bivalenten und der komplexen Tuberkuline (Tuberkuloproteine) überprüft.

1. Vergleichende Tuberkulinisierungen ergaben meistens eine hohe diagnostische Verlässlichkeit boviner gegenüber humanen Tuberkulinen (Tuberkuloproteinen).

2. Das bivalente Tuberkuloprotein (2 Teile bovines T. AN 5 und 1 Teil humanes T. PN 14) wies eine höhere Aktivität auf als die monovalenten Tuberkuloproteine.

3. Die allergene Wirksamkeit des komplexen sowjetischen Tuberkuloproteins wurde in einem mit *M. t. avium* angesteckten landwirtschaftlichen Betrieb an 183 Rindern und in 3 Zuchten an 201 Rindern, die mit *M. t. bovis* angesteckt waren im Vergleich zu den monovalenten Tuberkulinen (Tuberkuloproteinen) überprüft.

Die Ergebnisse lieferten den Nachweis, daß das komplexe Tuberkuloprotein sich zur Diagnostik der Rindertuberkulose eignet und daß bei Rindern, die mit *M. t. avium* angesteckt waren, stärkere Reaktionen auftraten als nach aviärem Koch *vetus* Tuberkulin in 50 % Verdünnung.

Bei Rindern, die sowohl auf bovines als auch auf aviäres Tuberkulin negativ reagierten, rief das komplexe Tuberkulin unspezifische Reaktionen bis zu 3 mm in der Zeit von 24 bis 72 Stunden hervor.

Essay on the activity of monovalent and bivalent human and complex tuberculins (tuberculo proteins)

On 229 pieces of cattle, infected with *Mycobacterium tuberculosis bovis* the allergenic activity of monovalent bovine and human, bivalent and complex tuberculins (tuberculo proteins) was studied.

1. The comparative tests demonstrated the prevalence of a higher diagnostical reliability of the bovines over the human tuberculins (tuberculoproteins).

2. The bivalent tuberculoprotein (2 parts of the bovine tuberculin AN 5 and 1 part of the human tuberculin PN 14) showed a higher activity than the monovalent tuberculoproteins.

3. The allergenic activity of the complex tuberculoprotein of sovietic origin was studied on a farm infected with *M. t. avium* (183 pieces of cattle) and on 3 farms infected with *M. t. bovis* (201 animals) in comparison with the monovalent tuberculins (tuberculoproteins).

The results showed, that the complex tuberculin is useful in the diagnostic of cattle tuberculosis. In cattle infected with *M. t. avium* were higher reactions than with 50% aviar Koch vetus tuberculin.

In cattle with negative bovine and aviar tuberculin tests the complex tuberculine produced non specific reactions till 3 mm from the 24. till the 72. hour.

Rozvoj zdravotního zabezpečení drůbeže v ČSSR

Před třemi lety byly v redakční radě „Veterinární medicíny“ rozpaky nad tím, zda je možno celé tehdy 10. číslo časopisu věnovat drůbežnické tematice. Tehdejší experiment se zdařil a publikované práce nalezly čilou odezvu nejen doma, ale i v zahraničí. Příležitosti, kdy „Veterinární medicína“ předkládá čtenářům po 3 letech druhé tematické číslo o drůbeži, je možno využít k tomu, abychom letmo zhodnotili, co se na úseku zdravotního zabezpečení za tuto poměrně krátkou dobu vykonalo.

Především je nutno vyzvednout skutečnost, že s rozvojem velkochovů vyrostla u nás v uplynulých 3 letech řada veterinářů-specialistů, kteří se zabývají výhradně problematikou zdravotního zabezpečení drůbeže a poskytují neocenitelné služby velkopodnikům, v nichž jsou zaměstnáni.

Dále bych chtěl vyzvednout, že ve všech krajích a v drůbežnicky vyspělých okresech máme nyní veterináře, kteří rovněž pečují jen o drůbež.

Veterináři pracují ve Výzkumných ústavech a stanicích zabývajících se drůbeží a ve Státním podniku pro šlechtění drůbeže, kde zabezpečují nejen diagnostiku, ale i šlechtění drůbeže na rezistenci proti chorobám a další výzkumné úkoly.

Veterinární služba v Biovetách zabezpečila v dostatečném předstihu výrobu účinných očkovacích látek pro hromadnou aplikaci ve velkochovech.

Veterinární odbor ministerstva zemědělství organizoval vypracování směrnic pro zabezpečení zdraví drůbeže, v rámci zdravotního zabezpečení ostatních hospodářských zvířat. Na jejich přípravě se podíleli nejenom všichni přední odborníci, ale v připomínkovém řízení široká veterinární veřejnost i zástupci chovatelských složek.

Rovněž na úseku výchovy kádrů bylo dosaženo nemalých úspěchů. Na veterinární fakultě v Brně došlo v roce 1961 k založení samostatné katedry pro choroby drůbeže a došlo k rozšíření výukových osnov týkajících se drůbeže. Z iniciativy této katedry bylo uspořádáno několik velmi navštívených seminářů s aktuální problematikou pro praxi.

Seminář pro doškolování veterinárních lékařů v Pardubicích a jeho pobočky uspořádaly řadu krátkodobých, většinou 3 týdenních kursů, kterými prošel velký počet veterinárních lékařů. Počínaje letošním rokem se má započít s dvousemestrálním specializačním postgraduálním školením veterinářů pro choroby drůbeže, rovněž při veterinární fakultě v Brně.

Na úseku knižních publikací se dostalo do rukou veterinární veřejnosti začátkem roku 1961, základní kolektivní dílo „Nemoci drůbeže“, které bylo odbornou praxí dobře přivítáno a v krátké době rozebráno.

Na úseku drůbežnického výzkumu, který se zejména mohutně rozrostl je třeba vyzvednout, že bylo dosaženo jednotné celostátní koordinace výzkumných úkolů, jejichž řešením se zabývají pracovní kolektivy na fakultách, SVVÚ a ve Výzkumném ústavu veterinárního lékařství. Právě v těchto dnech byl brněnský SVVÚ přeměněn ve Výzkumný ústav pro choroby drůbeže, pod vedením nestora našeho drůbežního veterinářství dr. J. Křivinky.

Rozvoj veterinární činnosti na drůbežnickém úseku nezůstal omezen jen na území našeho státu, ale projevil se ve velmi družné spolupráci s pracovníky ostatních zemí socialistického tábora i v rámci celosvětovém, zejména v účinné práci, kterou naši pracovníci vyvíjejí v rámci Světové vědecké drůbežnické společnosti (W. P. S. A.), v její evropské federaci a ve stycích se Světovou Veterinární drůbežářskou společností (W. V. P. A.).

Hlavní úkoly, které stojí v současné době před veterinární veřejností na drůbežnickém úseku je výchova kádrů a prohloubení jejich odborných znalostí, zejména prohloubení diagnostiky a stylu práce ve velkochovech. Zvlášť velké úkoly stojí před veterinárním výzkumem.

Předkládané číslo „Veterinární medicíny“, které bylo možno tentokrát zaměřit na speciální výsek problematiky — na parazitární choroby drůbeže — ukazuje, že veterinární výzkum není zaměřen jen na ověřování výsledků, ale že přináší řadu původních výsledků, které jsou přínosem nejenom v našich podmínkách, ale přínosem obecným, otevírajícím perspektivy veterinární i drůbežnické praxi.

Publikace shrnuté v tomto čísle se zabývají problematikou nových kokcidiostatik a terapií kokcidiózy kuřat a krůtat. Helminnologické práce věnují pozornost epizootologii, askaridózy, heterakidózy, geohelmintům vodní drůbeže a helmintofauně drobné- a velkochovů. Rovněž je sledován velmi zajímavý vztah mezi helmintofaunou kachen na rybnících ve vztahu k soužití mezipřenositelů těchto helmintů na určitých druzích vodních porostů. Tři práce se zabývají terapií kapilariózy, která byla do loňského roku prakticky neléčitelnou. Dále je popsána terapie taeniazí drůbeže a studie o patogenním působení některých motolic v zažívacím traktu kachen a holubů. Velmi zajímavá a podnětná je i práce o tlumení drůbežích ekto-parazitů pomocí fyzikálních insekticidů.

MVDr. Bedřich Klimeš, CSc
vědecký redaktor tématického čísla
o chorobách drůbeže

V Brně v lednu 1963.

- Kaláb D., Starošík L.: Biochemické studie o července vepřů. — VI.
Z imunologie proti července vepřů
Биохимическое исследование рожи свиней. — VI. Вопросы иммунологии про-
тив рожи свиней
Biochemische Studie über den Schweinerotlauf. — VI. Aus der Immuno-
logie gegen den Schweinerotlauf 177
- Pavlas M.: Příspěvek k hodnocení aktivity tuberkulinů
К вопросу оценки активности туберкулинов
Contribution à l'évaluation de l'activité des tuberculins 185
- Rossi L., Dokoupil S.: Studie aktivity monovalentních, bivalentních a
komplexních tuberkulinů (tuberkuloproteinů)
Изучение активности одновалентных, двухвалентных и комплексных туберку-
линов (туберкулопротеинов)
Die Aktivität monovalenter, bivalenter und komplexer Tuberkuline (Tu-
berkuloproteine)
Essay on the activity of monovalent and bivalent human and complex
Tuberkulins (Tuberculo-proteins) 195

Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA uveřejňuje studie, rozborů a vědecká pojednání o vyřešených úkolech výzkumu v oboru veterinární medicíny. Vydává Ústav vědeckotechnických informací ministerstva zemědělství, lesního a vodního hospodářství. Vychází šestkrát ročně. Celoroční předplatné 60 Kčs. Redakce: Praha 2, Mánesova 75, telefon 274551-8. Rozšiřuje Poštovní novinová služba. Objednávky a předplatné přijímá PNS — ústřední expedice tisku, administrace odborného tisku, Jindřišská ul. 14, Praha 1. Lze též objednat u každé pošty nebo doručovatele. Objednávky do zahraničí vyřizuje PNS — ústřední expedice tisku, odd. vývoz tisku, Jindřišská 14, Praha 1. Vytiskl Mír, novinářské závody, n. p., závod 2, provozovna 22, Legerova 22, Praha 2. A-02*31268

P O K Y N Y P R O A U T O R Y

Pro usnadnění redakčních a technických prací doporučujeme autorům dodržovat tyto zásady:

Rukopis pište pracím strojem s normalizovanou velikostí typů ob řádek (30 řádků o 60 úderech na stránku), a to jen po jedné straně normalizovaného formátu A 4. Na levé straně papíru uveďte své příjmení, křestní jméno, akademický titul, zaměstnání, zaměstnavatele a adresu, na kterou má být zasílána korespondence.

Rozsah práce nesmí překročit 8–14 stran na stroji psaných včetně tabulek a průkazního materiálu.

V textu označte místa, kde mají být grafy, tabulky a obrázky. Grafy a diagramy je nutné kreslit tuší na bílém kreslicím nebo pauzovacím papíře v jednotných rozměrech ve zvětšeném měřítku, a to:

a) šířka 18 cm (maximáln výška 26 cm) — po zmenšení o jednu třetinu bude štoček obrázku zhotoven na šířku sazby,

b) šířka 9 cm — po zmenšení budou zhotoveny na šířku sazky dva štočky nebo jeden bude oblomen sazbou.

Popisy musí být psány pomocí šablony, úměrně k velikosti grafu. Nevhovující grafy budou překresleny.

Obrázky podepište a očísľujte na zadní straně. Nepodlepujte je. Legendu od všech obrázků a grafů připojte na zvláštním papíře.

V seznamu literatury uvádějte jen práce citované v článku a tímto způsobem: jméno autora, časopis, ročník, číslo sešitu, stránka, rok vyjití (příklad: Jiran, E.: Veterinářství XI, 10, 371, 1961). U knih jméno autora, název knihy, nakladatelství, místo a rok vyjití. Je nutno citovat všechny spoluautory práce. Přenáší-li se citace z jiné práce, musí být uvedeno, odkud citace je čerpána.

Práci zašlete ve dvou kopiích (originál a průklep). Pro překlady připojte tři kopie souhrnu a nadpisu článku.

Práce musí obsahovat doporučení vedoucího pracoviště a prohlášení, že nebyla ani v jiné formě otištěna či zaslána k publikaci do jiných časopisů.

Je žádoucí, aby u vědeckých prací byla zachována tato forma:

Nadpis práce, úvod (význam práce, současný stav studované otázky, výklad problému), pracovní postup, část experimentální, rozbor výsledků, diskuse, závěr, seznam literatury uspořádaný abecedně podle autorů.

Redakce si vyhrazuje právo navrhnout autorovi zkrácení rukopisu a opravy jak byly navrženy recenzentem.