

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

5

ROČNÍK 11 (XXXIX)
PRAHA,
KVĚTEN 1966
CENA 10 Kčs

ÚSTAV
VĚDECKOTECHNICKÝCH
INFORMACÍ MZLH

Rídí redakční rada

Prof. MVDr. Emanuel Král, (předseda), člen korespondent ČSAV akademik Ivan Brauner, doc. MVDr. Jan Čarvaš, CSc., prof. MVDr. Jaroslav Dražan, CSc., prof. MVDr. Tomáš Gdovin, MVDr. Martin Lis, MVDr. Andrej Mačička, MVDr. Ladislav Polák, CSc., doc. MVDr. Oldřich Svoboda, doc. MVDr. inž. Jan Vlček, pplk. MVDr. Miroslav Vojáček, prof. MVDr. Jaroslav Vrtiak, CSc., MVDr. Ladislav Zima, MVDr. Alojz Žuffa, CSc.

Vedoucí redaktor František Němec

© Ústav vědeckotechnických informací MZLH, Praha 1965

■
Vědecký časopis **VETERINÁRNÍ MEDICÍNA** uveřejňuje studie, rozboru a vědecká pojednání o vyřešených úkolech výzkumu z oboru veterinární medicíny. Vydává Ústav vědeckotechnických informací ministerstva zemědělství a lesního hospodářství. Vychází měsíčně. Redakce: Praha 2, Slezská 7, telefon 257541. Celoroční předplatné Kčs 120,—

■
Научный журнал **VETERINÁRNÍ MEDICÍNA** публикует обзоры, анализы и научные статьи о разрешенных заданиях по научному исследованию в области ветеринарной медицины. Издает Институт научно-технической информации Министерства сельского и лесного хозяйства. Выход в свет ежемесячно. Редакция Прага 2, Слезска 7.

■
The scientific journal **VETERINÁRNÍ MEDICÍNA** publishes studies, analyses and scientific treatises about the solved research tasks in the line of the veterinary medicine. Published by the Institute of Scientific and Technical Information of the Ministry of Agriculture and Forestry Management. Issued monthly. Editorial office Prague 2, Slezská 7

■
Die wissenschaftliche Zeitschrift **VETERINÁRNÍ MEDICÍNA** veröffentlicht Studien, Analysen und wissenschaftliche Abhandlungen über die gelösten Forschungsaufgaben auf dem Gebiete der Veterinärmedizin. Herausgegeben vom Institut für wissenschaftlich-technische Informationen des Ministeriums für Land- und Forstwirtschaft. Erscheint monatlich. Redaktion Praha 2, Slezská 7

■
Le journal scientifique **VETERINÁRNÍ MEDICÍNA** publie les études, analyses et traités scientifiques concernant les tâches de recherches résous dans le domaine de médecine vétérinaire. Publié par l'Institut des renseignements scientifiques et techniques du Ministère de l'agriculture et des forêts. Paraît une fois par mois. Rédaction Prague 2, Slezská 7

IMUNOLOGICKÁ PROBLEMATIKA VO VETERINÁRNEJ MEDICÍNE

Charakteristikou súčasnej imunológie je snaha poznať zákonitosti imunologických procesov a v maximálnej miere ich uplatniť v praxi. Dnešnou prvoradou úlohou imunológie vo veterinárnej medicíne je využívať výsledky, ktoré vyplynuli z teoretického výskumu pre prevenciu a likvidáciu nákažlivých chorôb hospodárskych zvierat, a to diagnostickými a imunoprofylaktickými metódami. Poslaním veterinárnej imunológie je nielen dosiahnutie bezprostredného hospodárskeho efektu, ale aj sledovanie dopadu jednotlivých diagnostických a imunologicko-profylaktických akcií, ako sa oni prejavujú na ďalší priebeh a výskyt nákazy. Konečný úspech imunologického zákroku treba hodnotiť nielen podľa bezprostredného účinku prejavujúceho sa zdánlivým zlepšením nákazovej situácie a dosiahnutím ekonomických výsledkov, ale predovšetkým z toho hľadiska, akú úlohu zohrá pre dosiahnutie konečného cieľa, t. j. pre likvidáciu nákazy. Účinnosť prevencie uskutočňovanej cestou sérologických a alergických diagnostických testov, ktoré umožňujú odhalenie a elimináciu infikovaných jedincov, záleží ako od rýchlosti a intenzity imunologickej odozvy organizmu na infekciu, tak aj od spôsobu prenosu infekčného agens zo zvierata na zviera. Výsledok imunoprofylaktických zákrokov závisí nielen na účinnosti použitej imunizačnej metódy, ale aj od možnosti pôvodcu infekčného ochorenia pretrvávajú mimo objekt, na ktorom sa vakcinačný zákrok robí. Ak sa použije málo účinná imunizačná metóda, nemožno od nej očakávať likvidáciu nákazy v žiadnom prípade. Pri použití účinnej metódy majú pre likvidáciu alebo pretrvávajúce nákazy rozhodujúcu úlohu faktory prostredia, spektrum vnímavých zvierat, možnosti perzistencie infekcie mimo prirodzene vnímavé zviera v rozličných druhoch rezervoárových zvierat, aj mimo živý organizmus.

Prevencia a likvidácia nákaz hospodárskych zvierat sa uskutočňuje dvojakou cestou: 1. výberom infikovaných a ochranou zdravých zvierat, 2. účinnou a cieľavedomou imunoprofylaxiou.

Chýbanie imunizačnej metódy proti tej ktorej nákaze nemusí byť vždy v neprospech jej tlmenia, prípadne likvidácie. Ak je po ruke dostatočne spoľahlivá diagnostická metóda, ktorá zaručuje identifikáciu každého infikovaného zvierata, máme v rukách dostatočné prostriedky pre vedenie úspešného boja proti príslušnej nákaze.

Například při tlmení žrebčej nákazy sa vystačí s jedinou sérologickou reakciou — komplementfiksačným testom — při tlmení tuberkulózy s alergickou reakciou a při soplavke s kombináciou serologickej reakcie s alergickou skúškou. Ďalším prepokladom úspechu v takomto prípade je, že infekcia sa obmedzuje len na jeden, prípadne niekoľko málo druhov hospodárskych zvierat a niet trvalých prírodných zdrojov infekcie.

Na druhej strane sú nákazy, u ktorých nemáme doposiaľ jednoduchú a spoľahlivú diagnostickú metódu, prípadne ak aj je k dispozícii, vyhľadávaním infikovaných zvierat a ich vyraďovaním sa nevystačí při tlmení nákazy. Ak v takýchto prípadoch máme po ruke účinné metódy imunoprofylaxie, konečný efekt ich použitia závisí opäť na možnosti pretrvávania infekcie mimo objektu zasažiteľného vakcinačným zákrokom. Aj keď napríklad při more ošipaných niet doposiaľ rýchlej a spoľahlivej diagnostickej metódy vhodnej pre rutinne použitie, možno od cieľavedomej imunoprofylaxie očakávať likvidáciu nákazy len preto, že mimo ošipanej niet iného zvierata vnímateľného na prirodzenú infekciu. Naopak při červienke ošipaných neskytá, vzhľadom na ubikvitárny výskyt červienkových zárodkov ako aj na skutočnosť, že vakcinačný zákrok neovplyvní prežívanie virulentných zárodkov u vakcinovaných zvierat, ani najlepšia imunizačná metóda viacej nádeji, ako že sa jej pomocou podarí na minimum obmedziť hospodárske straty.

Při voľbe imunizačných metód proti nákazlivým chorobám hospodárskych zvierat prevláda v posledných rokoch tendencia používať živé vakcíny. Obavy zo zmeny modifikovaného vakcinačného kmeňa v plne virulentný a tým vytváranie nových ohniskov infekcie, boli už vo väčšine prípadov prekonané. Prispeli k tomu najmä pokroky dosiahnuté vo virologickej technike v posledných rokoch, ktoré umožňujú získať jednak geneticky čisté línie s homogénnou vírusovou populáciou, jednak pomocou markerov sledovať antigénnu a genetickú stabilitu vírusov. Vo väčšine prípadov prevyšujú živé vakcíny vakcíny inaktivované svojou imunogenitou, rýchlosťou nástupu a pretrváváním imunitného stavu, možnosťami jednoduchého a rýchleho spôsobu aplikácie a v neposlednej miere ekonomikou výroby.

V minulosti vo veľkom rozsahu používaná séroterapia bakteriálnych infekcií stratila dnes, uplatnením so chemoterapeutík a antibiotík, na svojom niekdajšom význame. Na druhej strane nie je vždy docenená hodnota ochranných sér proti vírusovým infekciám. Experimentálne výsledky predložené v poslednom čase poukazujú na potrebu revidovať staršie názory na profylaktickú, prípadne aj terapeutickú hodnotu hyperimúnných sér proti virózam ľudí i zvierat. Stačí pripomenúť úlohu, akú hrajú, resp. zohrali ochranné séra u ľudí při prevencii Botkinovej choroby, poliomyelitídy a osýpok, u zvierat při Rubáর্থovej chorobe, psinke, more ošipaných a slintačky a krívačky.

Aj vo veterinárnej medicíne je však treba zaujať zamietavé stanovisko k používaniu heterológnych sér. Výnimky je možno pripustiť len při sérach, ktorých výroba je na druhu, pre ktorý sú určené, z technických alebo ekonomických príčin nemožná.

Kritický náčrt aktuálnej problematiky užitej veterinárnej imunológie poukazuje na šírku i rozmanitosť existujúcich problémov. Dokumentuje, že podmienujú úspešného boja s nákazlivou je znalosť všetkých faktorov určujúcich vznik, vývoj, prebeh a trvanie infekčného procesu. Pre dosiahnutie maximálneho efektu musia metódy lmenia vychádzať z dokladného poznania vlastností pôvodu, odpovedí makroorganizmu na nákazlivinu a faktorov vonkajšieho prostredia na mikro a makroorganizmus. Prístup k lmeniu tej ktorej nákazy je preto rozdielny podľa jej povahy. Pri jednej spočíva ťažisko vo vyhľadávani a eliminácii reagentov, pri druhej špecifickej imunoprofylaxii, prípadne v ich kombinácii. Lmenie ďalších si vyžaduje likvi-

Budúcnosť ukáže, akú úlohu zohrá tento prístup k lmeniu infekčných ochorení hospodárskych zvierat.

Azda najväčšie a už v praxi využívané úspechy sa v tomto smere dosiahli pri štachtení lmiu sliepok odolných proti infekčnej lymfomatóze. Zameralenie výskumu týmto smerom si vynútila skutočnosť, že u leukóz hydiny niet doposiaľ spoľahlivých metód diagnostiky a imunoprofylaxie.

V posledných rokoch sa rysuje celkom nová cesta, ktorá môže priniesť úspech pri lmeni niektorých nákazlivých chorôb hospodárskych zvierat. Ide o vyhľadávanie lmiu zvierat odolných proti infekčným chorobám na genetickom základe.

Novou a sľubnou cestou k ozdraveniu hospodárskych zvierat od nákazlivých chorôb sa ukazuje odchov chorôb prostej populácie zvierat, zisťovanej v sterilnom a neskôršie nákazy prostom prostredí. Takéto chovy predstavujú základ v ozdravení vacom procese. Zdá sa, že pri vírusovej pneumónii a atrofickej rinitide ošpaných je to jediná cesta k ozdraveniu.

Našich pomeroch sa až domedáva venovala pozornosť imunologickému výskumu helmintóz. Helmintologický výskum sa vo veterinárnej medicíne sústreďoval hlavne na typizáciu a geografické rozšírenie helmintóz a nevyužívali sa v žiadnej miere pokroky v séro- prípadne alergodiagnostike helmintóz a ich špecifickej imunoprofylaxii. Treba preto s potešením konštatovať, že v posledných rokoch orientovali niektoré helmintologické pracoviská svoju výskumnú prácu aj týmto smerom. Dá sa očakávať, že výsledky, ktoré na tomto poli dosiahli, najmä v krátkom čase praktické uplatnenie.

Odolnosť mláďat proti infekčným chorobám sa viaže na ochranný účinok proti látok získaných kolostrom. Treba povedať, že okrem ochrany pred infekciou môže kolostálna imunita pôsobiť aj v negatívnom zmysle, a to inhibične na tvorbu aktívnej imunity po vakcinačnom zákroku. Výsledok vakcinačného zákroku záleží v takýchto prípadoch okrem veku zvierat a výške hladiny protilátok cirkulujúcich v krvi, aj na kvalite a množstve antigénu a spôsobe jeho podania, ako aj na časovom odstupe medzi získaním protilátok a vakcinačným zákrokom.

Namiesto doteraz používaných surových séra treba pristupovať k zavádzaniu purifikovaných koncentrovaných bielkovinových frakcií, na ktoré sú naviazané protilátky.

ďáciu zamorených chovov a odchov zdravého potomstva v čistom prostredí alebo výber chovných línii, prirodzene odolných proti infekcii. Pri niektorých nákazlivých chorobách niet zatiaľ reálnych predpokladov, že by ich bolo možné úplne vykoreniť. V takýchto prípadoch neostáva nič iné, ako profylaktickými opatreniami obmedziť na minimum hospodárske straty.

Doc. Dr. Alojz Žuffa, C. Sc.

Oddelenie pre vývoj a výskum, Bioveta n. p., Nitra

■ Escherichiosy (koliinfekce) selat v raném období postnatálním, představované kolisepsí- a kolienteritidou, jsou zjišťovány nejčastěji ve vrzích primipar. Objevují se však i případy enzootických výskytů u všech vrhů ve stáji. Uvedené dvě nosologické jednotky nelze zpravidla klinicky rozlišit, jelikož obě se projevují průjemem.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Baktericidní rod *Escherichia* zahrnuje velkou řadu g-tyčinek jak saprofytických tak i patogenních, označovaných shodně jménem *Escherichia coli* a zařazených sem na základě biochemické aktivity definované pro tento rod. Bližší jejich rozlišení je možné pouze na bázi sérologické, vypracované v r. 1943 *Kauffmanem* (1943, 1947).

Na zvláštní poměry u koliinfekcí prasat upozornil v r. 1957 a 1960 *Sojka* a spol. (1957, 1960). U kmenů z případů edémové nemoci nalézali hlavně antigeny 0139:K82(B), 0141 a 08. U případů enteritid selat to byly převážně kmeny s antigeny 0141, 08 a 0138. Podobné nálezy určili i jiní autoři (*Geurden*, *Spence* a *Sojka* 1960, *Wittig* 1963), z nichž někteří uváděli ještě další sérotypy podezřelé z patogenity pro selata.

Experimentálně byla prokázána patogenita sérotypů *Escherichia coli* 08:K87(B)K88(L) a 0141:K85(B)K88(L) pro novorozená selata (*Saunders*, *Stevens*, *Spence*, *Sojka* 1963, *Saunders*, *Stevens*, *Spence*, *Betts* 1963) a pro selata odstavovaná ve stáří 3 týdnů (*Chopra*, *Dale* 1964).

Na rozdíl od kolienterotoxemie odstávčat, u níž jsou nalézány hlavně hemolytické varianty, jsou u gastroenteritid selat novorozených izolovány převážně nehemolytické kmeny *E. coli* (*Roberts*, *Vallley* 1959).

Kromě faktoru kvalitativního, tj. specifity určitých sérotypů při escherichiosách, je pro vznik onemocnění důležitý též faktor kvantitativní (*Kauffman*, *Perch* 1943, *Kienitz* 1965, *Nordbring*, *Olsson* 1957). U nemocných jedinců bývá koliformní flóra ve fécés představována zpravidla monokulturou patogenního sérotypu *E. coli*, kdežto při nálezů patogenních typů u jedinců zdravých nebo bacilonosičů bývá patogenní typ zjišťován jen jako malý podíl koliflóry představované směsí více sérotypů (*Kauffman*, *Perch* 1943, *Kienitz* 1965, *Nordbring*, *Olsson* 1957).

Endotoxin g-tyčinek je lipopolysacharid totožný s O-antigenem. Vyznačuje se podle Westphala (1957) tím, že jeho vysoce toxický podíl lipidický je neantigenní, kdežto netoxická část polysacharidová je nositelem antigenní specifity.

Patogenita kmenů *E. coli* spočívá podle Kauffmanna (1947) v kombinovaném účinku antigenů O (somatického) a K (povrchového nebo kapsulárního). De Witt a Allen (cit. 6) upozorňují, že hlavní protektivní protilátkou proti kmenům *E. coli* je protilátka proti jejich K-antigenům. Stejný názor zastává i Fey (1964), který dodává, že protilátky proti *E. coli* nemají účinku antitoxického, ale působí pouze antibakteriálně, tj. opsonisací.

Někteří autoři (Blaga, Radojčević, Mihajlovič 1964, Mansson 1962, Möhlmann 1963) popisují úspěšné použití vakcinace krav a prasnic nebo používání imunního kolostra pro prevenci kolinfekcí mláďat po narození. Požití imunního kolostra však nezabraňuje kolonizaci střeva patogenním kmenem *E. coli*, takže mláďata, přestože jsou chráněna, stávají se jeho rezervoárem (Schoenaers, Kaackenbeek 1964).

Owen a spol. (1961) prokázali, že protilátky přijímané mláďaty v kolostru a pak v mléce představují důležité ochranné agens i v pozdější době, když již nedochází k jejich prostupu stěnou střevní. Jelikož selata aktivně imunologicky reagují teprve v 5–6 týdnech věku, uplatňují se pasivně přijímané protilátky v mléce jako koproantilátky.

Koproantilátky prokazované u enterálních infekcí lidí vznikají ve sliznici střevní a jsou ve stolici prokazatelné mnohem dříve nežli v séru krevním. Cirkulující protilátky tohoto původu představují pouze jejich akumulaci a neúčastní se na vlastní ochraně organismu proti enterálním infekcím (Wagner 1959).

S působením antigenů na sliznici zažívacího traktu úzce souvisejí i tzv. „přirozené protilátky“ proti řadě příslušníků čeledi *Enterobacteriaceae*. Za podmínek normální kolonizace střeva jsou antigeny intestinální flóry hlavním stimulem pro produkci těchto protilátek (Miler, Šterzl, Kostka, Lanc 1963).

Kromě protilátek pocházejících ze séra jsou v kolostru a v mléce též protilátky produkované samotnou mléčnou žlázou, které jsou zde vytvářeny jako odpověď na antigeny deponované intramamárně mláďaty při sání (Campbell, Petersen 1963, Greenbaum, Miller 1960). Při umělém podání antigenů dučejem strukovým byly zjišťovány protilátky v mléce již za 1–2 dny, kdežto v krevním séru se objevily až za týden (Sarwar, Campbell, Petersen 1964). Nejen kolostrum, ale i mléko má prokazatelné titry aglutininů proti různým sérotypům *E. coli* (Portmann 1962). I když jsou titry protilátek v mléce nižší než v krvi, má mléko specificky imunizovaných zvířat protektivní účinek na pokusná zvířata infikovaná kulturami *E. coli*, Shigell a Salmonell (Butko 1964).

Výsledky laboratorních a terénních vyšetření, o nichž je zde referováno, jsou úvodní etapou výzkumu zaměřeného na problematiku gastroenterálních poruch u selat, vyvolávaných zárodky z rodu *Escherichia*. Tato šetření byla zaměřena na

1. sérologická určení O-antigenů většího počtu kmenů *Escherichia coli* izolovaných z případů průjemových onemocnění selat v raném postnatálním období;
2. sledování výskytu sérotypů *E. coli* podezřelých z patogenity pro novorozená selata v chovech s enzootickým výskytem průjmů selat;
3. informativní vyšetření souvislosti terénního výskytu průjmů u selat s imunitním stavem matek charakterizovaným hladinou aglutininů proti K- a O-antigenům stájově specifických kmenů *E. coli*.

MATERIÁL A METODIKA

Kmeny *E. coli* pro sérotypizaci byly zakládány z koliformních porostů vykultivovaných z parenchymatosních orgánů selat uhynulých na kolisepsi, ze střevního traktu selat uhynulých na kolienteritidu a z trusu selat živých, trpících průjmy v raném postnatálním období. Menší část kmenů byla získána z pracovišť ÚSVÚ a z Biovety v Ivanovicích na Hané. Celkem bylo vzato do práce 1045 kmenů *E. coli* ze 659 kusů selat.

Jako základní srovnávací materiál pro sérotypizaci byly použity standardní kultury *E. coli* z International Escherichia Centre, Copenhagen s O-antigeny 01 — 0145 a s K-antigeny K1 — K89.

Vzorky krve pro vyšetření imunitního stavu prasat v terénu byly odebírány punkcí ušní žíly od prasnic v lokalitách s enzootickým výskytem kolienteritid u novorozených selat.

Sérologická typizace zahrnovala vyšetření všech kmenů *E. coli* na O-antigeny. U několika terénních kmenů *E. coli* izolovaných v lokalitách, kde byla prováděna sérologická depistáž, byly informativně určeny i K-antigeny. K těmto typizacím jakož i k vyšetření hladin protilátek u prasnic proti stájovým sérotypům *E. coli* bylo použito pomalé aglutinace podle Edwardse a Ewinga (1957).

K typizaci bylo použito 51 typově specifických sér. Výběr těchto sér byl proveden tak, že byla použita séra těch O-typů, o nichž byly v dostupné literatuře nalezeny údaje o jejich výskytu při onemocnění lidí a hospodářských zvířat. Dále byla zařazena séra připravená použitím terénních kmenů, jejichž typová příslušnost byla zjištěna dodatečně pomocí O-antigenů 01 — 0145 typových kmenů z Kodaně. Použitým souborem sér bylo možno určit tyto O-antigeny *E. coli*: 01, 02, 03, 04, 06, 08, 09, 011, 013, 015, 019, 020, 021, 023, 024, 026, 028, 035, 041, 043, 049, 055, 056, 073, 076, 077, 078, 083, 086, 088, 0101, 0102, 0103, 0108, 0109, 0111, 0112, 0114, 0115, 0117, 0119, 0125, 0128, 0133, 0135, 0137, 0138, 0139 a 0141. Další dvě používaná séra, připravená z vlastních terénních kmenů č. 15 a č. 1869, neaglutinovala žádný z typových antigenů 01 — 0145.

VÝSLEDKY

A. AGLUTINAČNÍ URČENÍ O-ANTIGENŮ U KMENŮ *E. coli* (OBR. 1)

Ve skupině průjmů selat bez sepsí bylo typováno 929 kmenů z 572 kusů selat. Jelikož u případů, kdy byly typovány 2—3 kmeny z téhož zvířete, byly zjištěny až na ojedinělé výjimky shodné O-antigeny, je hodnocen každý kus jen jedním kmenem.

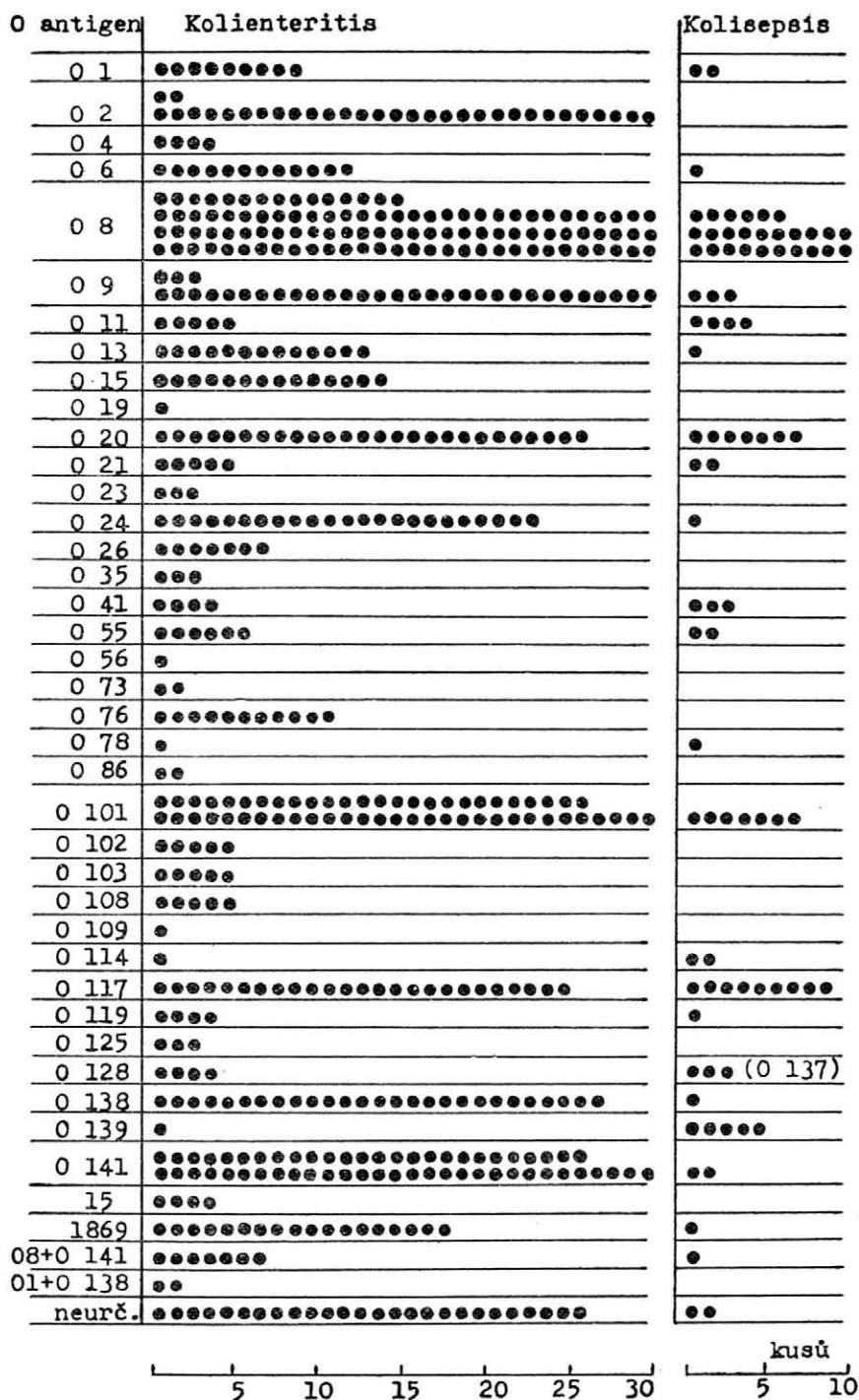
Použitím 51 aglutinačních sér bylo z 572 případů zařazeno podle O-antigenů 546, tj. 95,5 %. Dvanácti séry (03, 028, 043, 049, 077, 083, 088, 0111, 0112, 0115, 0133 a 0135) nebyl aglutinován ani jediný kmen. Tato séra nejsou proto v grafu uvedena.

Převážná část případů — 62,8 % (359 ks) byla zařazena k osmi typům: 08 — 18,4 % (105 ks), 0101 — 9,8 % (56 ks), 0141 — 9,8 % (56 ks), 09 — 5,8 % (33 ks), 02 — 5,4 % (31 ks), 0138 — 4,7 % (27 ks), 020 — 4,5 % (26 ks), 0117 — 4,4 % (25 ks).

U menší části kmenů — 32,7 % (187 ks) bylo možno zjistit některý ze 30 jiných O-antigenů. Nezařazeno zůstalo 4,5 % případů.

Ve skupině kolisepsí bylo typováno 116 kmenů *E. coli* izolovaných z 87 uhynulých selat. Zařazeno bylo 85 případů, tj. 97,5 %. Větší frekvence antigenů u případů kolisepsí byla zjištěna u 08 — 30 % (26 ks), 0117 — 10,2 % (9 ks), 020 — 8 % (7 ks) a 0101 — 8 % (7 ks).

Při hodnocení časového výskytu sérotypů je nápadné, že antigen 0117 byl z převážné části identifikován u selat narozených v roce 1965. V tomto roce byl z 38 vyšetřovaných případů kolienteritid zjištěn u 20 selat a z 10 případů kolisepsí u 5 selat.

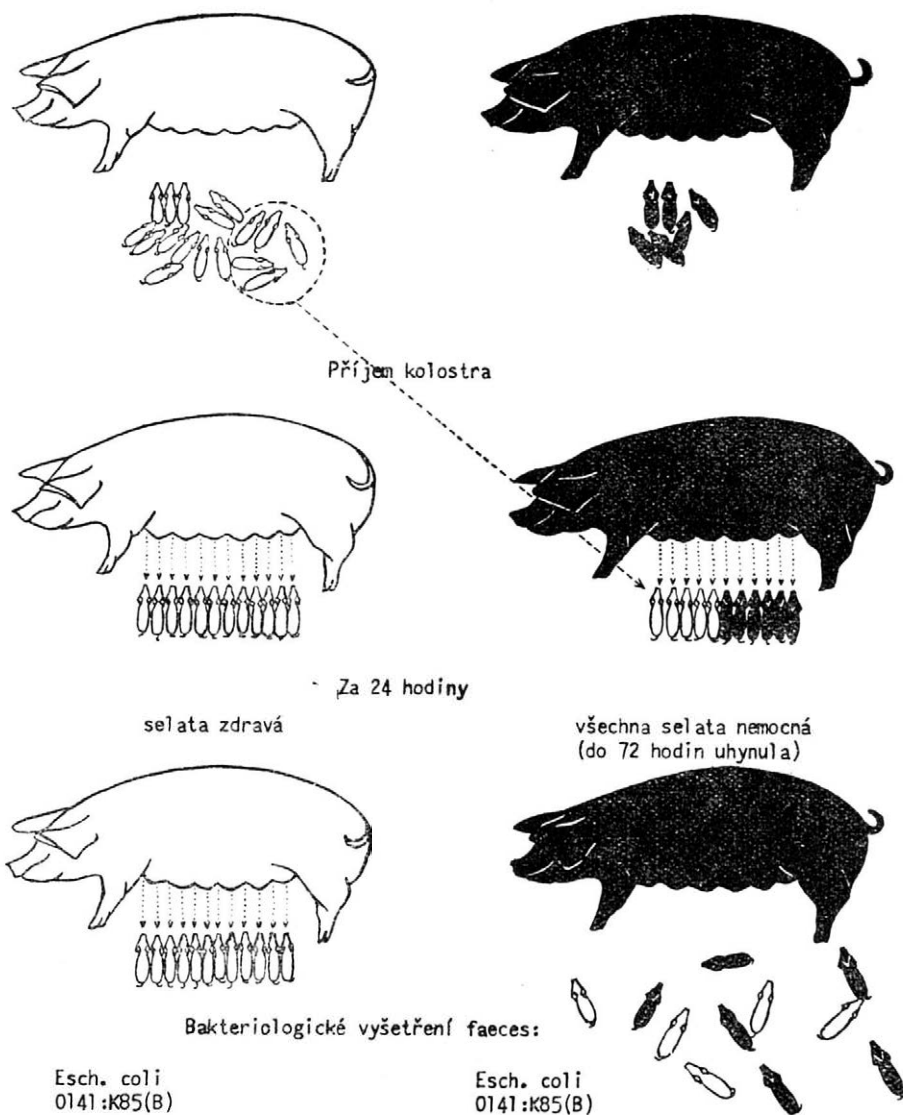


Obr. 1. Escherichiózy u selat. Frekvence sérotypů *Esch. coli* podle O-antigenů z 572 případů kolienteritid a z 87 případů kolisepsí.

0	antigen	Chlumec	M. Knínice	Mistřín	Tasov	Vacanovice	Vacenovice	Vážany	Větrná
0 1				•	•••	•			•
0 2	••			••••	••••••••	•			•
0 6	•			•••	•••			•	•
0 8	••••••		••••••••••	••••••••••	••••••••••	••••••••••	••••••	••••	••••
0 9	•••		•••	•••	•		•••••••	•••	•••••••
0 13	••			•••••					•••
0 15			••	•	•••	•			••
0 20	••		••	•	••••	•		•	••
0 24					•••	••••		•	••
0 26				•	•••	•			•
0 55				•••					•
0 101	•••• ••••••••••			••••	•••••••	••••	•		••
0 103			•		•••				
0 119				••			••		
0 138				•				•••• •••••••••• ••••••••••	
0 141			•	••••••	•••••••••• ••••••••••	••			•••• •••••••••• ••••••••••
1869			•	••••		•			•••
08+0141					•			•	•••••
jiné	•		•	••••••••	••••	••••••••	•	••	••••••••
neurč.	•••			•••••	•••••••	•			•

Obr. 2. Escherichiózy u selat. Výskyt sérotypů *Esch. coli* podle O-antigenů v lokalitách s hromadným výskytem onemocnění.

Současný porod u dvou prasnic



Titř aglutininů anti-Esch. coli 0141:k85(B)

	K	O
10	+	+
20	+	+
40	+	+
80	+	+
160	+	-
320	-	-

	K	O
10	-	-
20	-	-
40	-	-
80	-	-
160	-	-
320	-	-

Obr. 3. Souvislost kolienteritidy selat s imunitním stavem matek.

B. STÁJOVĚ SPECIFICKÝ VÝSKYT SÉROTYPŮ *E. coli* V SOUVISLOSTI S ENZOOTICKÝM VÝSKYTEM KOLIENTERITIDY U SELAT (OBR. 2)

Frekvence jednotlivých sérotypů *E. coli* v chovech s enzootickým výskytem průjmů selat se vyznačuje tím, že v každé stáji byl zjištěn jeden nebo dva sérotypy dominující nad ostatními. Ve všech případech převládající kmeny patří do skupin s O-antigeny zjišťovanými zvláště často u nemocných selat (08, 0101, 0138, 0141).

C. SOUVISLOST KOLIENTERITIDY SELAT S IMUNITNÍM STAVEM MATEK (OBR. 3 A 4)

Na grafu č. 3 je znázorněn terénní případ z výskytu kolienteritidy u selat ve velmi dobře vedené produkční stanici velkovýkrmny prasat v Hodoníně. K malému vrhu selat importované cornwalské prasnice bylo přidáno několik novorozených selat od prasnice domácího chovu, která se oprasila ve stejnou dobu. Na druhý den se objevil profusní průjem u všech selat kojených prasnicí cornwalskou. V následujících dvou dnech všechna tato selata, tj. černá cornwalská i přidaná bílá uhynula. Selata ponechaná u bílé prasnice domácího chovu zůstala zdravá. Při bakteriologickém vyšetření uhynulých selat byly parenchymatózní orgány sterilní. Ze střevního obsahu uhynulých selat byla izolována *E. coli* s antigenní strukturou 0141:K85(B), což je sérotyp pokládáný za patogenní pro tato mláďata. Avšak tentýž sérotyp *E. coli* byl prokázán i v trusu zdravých selat od bílé prasnice. Při sérologickém vyšetření obou prasnic bylo zjištěno, že bílá prasnice domácího chovu měla výrazný titr aglutininů proti K- i O-antigenům stájového typu *E. coli*, kdežto u černé cornwalské prasnice, nedávno importované jako březí, tyto protilátky prokázány nebyly.

Srovnání sérologického vyšetření dvou chovů, v nichž byl nacházen stejný patogenní sérotyp *E. coli* a kdy k onemocnění docházelo jen v jednom z nich, je uvedeno na grafu 4. V chovu prasat JZD Vacanovice probíhala v zimě a na jaře r. 1964 těžká enzootie průjmů ve všech vrzích selat. Při vyšetření 30 selat z různých vrhů byla u 20 ks izolována ze zažívad, event. z parenchymatózních orgánů hemolytická monokultura *E. coli* sérotypu 08:K88(L). Sérologické vyšetření prokázalo, že u prasnic byly sice přítomny aglutininy proti somatickému antigenu 08, avšak proti povrchovému antigenu K88(L) byly jen ojedinělé velmi nízké hladiny aglutininů.

Vyšetření prasnic v JZD D. Bojanovice, kde byl tentýž sérotyp *E. coli* sporadicky prokazován, ale kde se objevovaly u selat jen ojediněle mírné případy průjmových onemocnění ukázalo, že prasnice v tomto chovu měly velmi výrazné titry protilátek proti *E. coli* 08:K88(L), hlavně aglutininů proti K-antigenu.

Podobné poměry imunologické jako v lokalitě Vacanovice byly zjištěny i při stájovém výskytu jiných podezřelých sérotypů *E. coli* v souvislosti s onemocněním selat v dalších lokalitách: Vážany [0138:K81(B)], Tasov [0141:K85(B)] a Chlumec [0101:K30(A)].

DISKUSE

Vznik escherichios (koliinfekcí) u selat v raném postnatálním období je podmíněn dvěma základními příčinami. Prvou je etiologické agens představované druhově patogenním sérotypem *E. coli*. Druhou podmínkou je vnímavost selat předsta-

Chov s výskytem dyspeptických průjmů u novorozenců selat.
U uhynulých kusů byla opětovně izolována *E. coli* 08:K88(L).

číslo prásnic	titr							
	10	20	40	80	160	320	640	1280
2	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	-	-	-	-	-	-	-
8	#	#	-	-	-	-	-	-
14	+	-	-	-	-	-	-	-
15	#	-	-	-	-	-	-	-
18	-	-	-	-	-	-	-	-
21	+	-	-	-	-	-	-	-
27	+	-	-	-	-	-	-	-
34	+	-	-	-	-	-	-	-
41	+	-	-	-	-	-	-	-
44	#	+	-	-	-	-	-	-
45	-	-	-	-	-	-	-	-
100	#	+	-	-	-	-	-	-
103	-	-	-	-	-	-	-	-
110	+	-	-	-	-	-	-	-
114	-	-	-	-	-	-	-	-
140	#	-	-	-	-	-	-	-
143	-	-	-	-	-	-	-	-

[illegible]

Chov bez výskytu dyspeptických průjmů u novorozených selat. Ve stáji byla opětovně izolována *E. coli* 08:K88(L).

číslo prasníc	aglutininy anti-K88									
	titr	10	20	40	80	160	320	640	1280	
012	##	##	#	#	+	-	-	-	-	
50	##	##	##	#	+	-	-	-	-	
58	##	#	#	#	+	-	+	-	-	
147	##	##	##	##	#	#	+	-	-	
182	##	##	##	##	#	#	+	-	-	
226	##	##	##	#	#	+	-	-	-	
331	##	##	##	#	+	-	-	-	-	
401	##	##	##	#	#	#	+	-	-	
411	##	##	##	#	#	#	+	-	-	
423	##	##	##	#	#	#	+	-	-	
424	##	##	##	#	-	-	-	-	-	
426	##	##	##	#	#	#	-	-	-	
427	##	##	##	#	#	+	-	-	-	
439	##	##	##	+	-	-	-	-	-	
501	##	##	##	#	#	+	-	-	-	
511	##	##	##	#	#	#	+	-	-	
516	##	##	##	+	-	-	-	-	-	
517	##	##	##	#	#	#	+	-	-	
524	##	##	##	#	+	-	-	-	-	

agglutiny anti-O8	
10	20
10	20
40	40
80	80
160	160
320	320
640	640
1280	1280

Obr. 4. Sérologické vyšetření dvou chovů prasat s nálezem stejného sérotypu *Esch. coli*. Srovnání chovu s výskytem průjmů u selat s chovem zdravým.

vovaná specifickou imunitní karencí závislou na nepřítomnosti specifických protilátek u matek. Uvedené dvě okolnosti vysvětlují dlouho tradovaný názor o podmínečné patogenitě *E. coli*.

Pro novorozená selata se jeví jako patogenní nebo jako podezřelý z patogenity sérotypy *Esch. coli* s O-antigeny 08, 0141, 0101, 09, 02, 0138, 020 a 0117. Tyto typy byly nacházeny jako nejčastější v souboru 572 kusů selat trpících průjmy.

Vyšetřená skupina 87 případů koliseptisy není dost početná pro směrodatné vyjádření. Avšak i zde byly u převážné části kmenů nalézány O-antigeny stejné jako u kolienteritidy.

Ve výskytu patogenních sérotypů *E. coli* se projevuje střídání, jak ukazuje nález kmenů s O-antigenem 0117: tento O-antigen byl v letech 1961–64 zjišťován jen ojediněle, avšak v roce 1965 převládl nad ostatními. Podobná situace je v humaní medicíně, kde v poslední době je jako zvlášť nebezpečný pro kojence uváděn sérotyp se somatickým antigenem 0127, vyskytující se mnohem častěji než dříve (Kienitz 1965, Ocklitz 1965).

Nebude žádným překvapením, když v budoucnu budou za patogenní pro selata pokládány i jiné sérotypy než jsou zde uváděné.

Srovnání výsledků typizace kmenů *E. coli* z několika lokalit s výskytem onemocnění ukázalo, že v každé stáji převládá jeden nebo dva typy nad ostatními. Převládající typy nejsou ve všech stájích stejné. Tento nález může sloužit k upřesnění termínu „stájová nákaza“. Rovněž může být vysvětlením některých neúspěchů při používání stájových vakcín připravených z materiálu vybraného namátkově a odůvodňuje nutnost vyšetření většího počtu uhynulých nebo nemocných zvířat pro objasnění situace ve vyšetřovaném stádě. V případě výskytu několika podezřelých sérotypů v jedné stáji může být sérologické vyšetření prasnic indikátorem pro určení sérotypu patogenního pro danou stáj.

Imunitní stav prasnic zahrnuje imunitní odezvu na překonané infekce a na umělé imunizace, ale hlavně je obrazem lokální interakce tkáňových systémů účastnících se imunitních pochodů s velmi četnými antigeny v zažívacích, event. v mléčné žláze.

Častý výskyt kolinfekcí ve vrzích primipar a prasnic nově do stáda zařazených nasvědčuje tomu, že je zřejmě nutná delší doba k přirozenému proimunizování prasnic proti většímu počtu antigenů a proti stájově specifické mikroflóře. Z této okolnosti vyplývá potřeba některých preventivních opatření charakteru zootechnického jako je uzavřený oběh stáda s odchovem prasnic v tom prostředí, v němž budou prožívat i období produkce. I při těchto opatřeních nadále zůstává neodstraněna možnost infekce stáda novým sérotypem *E. coli*, který může vyvolávat onemocnění selat, dokud se prasnice neproimunizují.

Účinek specifických protilátek proti *E. coli* se projevuje pouze útlumem v růstu kultur (Portmann 1962) a v opsonizaci bakteriálních buněk (Fey 1964). U kolienteritidy mohou tedy protilátky zasáhnout jen v přímém styku s vlastními původci onemocnění ve střevním traktu. Nelze zde očekávat výrazný účinek specifických antisér po parenterální aplikaci. Tento terapeutický zásah je opodstatněn jen u případů s bakteriemií.

Na základě poznatků zde uváděných lze uvažovat o potřebě vyzkoušení některých zákroků pro tlumení kolinfekcí novorozených selat, jako je: a) imunizace prasnic stájovými vakcínami připravenými z kmenů vybraných na základě sérologické typizace většího počtu kultur *E. coli* z dotyčné stáje a na základě prošetření imunitního stavu prasnic; b) profylaktické či léčebné použití specifických hyperimunitních sér u novorozených selat. U kolienteritidy je třeba uvažovat o několikadenní perorální aplikaci sér jako náhradě protilátek přijímaných selaty v kolostru a mléce od imunních matek a účinkujících ve střevě jako koproantilátky, dokud je selata sama aktivně nevytvářejí.

SOUHRN

Bylo provedeno sérologické vyšetření O-antigenů u 1045 kmenů *Escherichia coli* ze 659 kusů selat onemocnělých průjmy brzo po narození. Na základě nejčastějšího výskytu O-antigenů lze považovat kmeny *E. coli* s O-antigeny 08,

0141, 0101, 09, 02, 0138, 020 a 0117 za patogenní nebo podezřelý z patogenity pro selata v raném postnatálním období.

U některých uvedených O-antigenů byl zjištěn stáje specifický výskyt.

Sérologickým prošetřením prasníc v chovech s enzootickým výskytem kolienteritid a prasníc v chovu zdravém byla zjištěna souvislost výskytu onemocnění selat s imunitním stavem matek. V chovech s hromadným výskytem průjmových onemocnění u selat byl u prasníc zjištěn nedostatek aglutininů proti K-antigenu stáje specifického sérotypu *E. coli*.

Došlo dne 30. 12. 1965

Technická spolupráce Z. Šarmanová, A. Ráboňová.

Literatura

1. BLAGA, M. - RADOJČEVIĆ, M. - MIHAJLOVIĆ, B.: Značaj antitela u zaštiti teladi od kolibaciloze. I. Zaštitna vrednost polivalentne vakcine. = „Vet. Glasn.“ 18, 1964, 511-517. — 2. BUTKO, M. P.: Immune milk. = „Trudy vsesojuz. Inst. vet. sanit.“ 22, 1963, 110-141. In: „Vet. Bull.“ 34, 1964, 337-338. — 3. CAMPBELL, B. - PETERSEN, W. E.: Immune milk - A historical survey. = „Dairy Sci. Abstr.“ 25, 1963, 345-358. — 4. EDWARDS, P. R. - EWING, W. H.: Identification of Enterobacteriaceae. = „Minneapolis, Burgess Publishing Company“ 1957, s. 179. — 5. FEY, H.: Kritische Betrachtungen zur Immunoprophylaxe bei Kälberaufzuchtserkrankungen. „Wien. tierärztl. Mschr.“ 51, 1964, (Festschr.), 92-99. — 6. GAY, G. C. - MC KAY, K. A.: Studies on colibacillosis of calves. I. The antibody acquired by calves as the result of vaccination of the dams. = „Canad. vet. J.“ 5, 1964, 248-261. — 7. GEURDEN, L. M. F.: Pathogenic coli in veterinary pathology. Proc. XVIth Int. vet. Congr. 1. Madrid, 1959, s. 247-253. — 8. GREENBAUM, D. S. - MILLER, L.: Antibody in milk and its role in passive immunization. = „J. Lab. Clin. Med.“ 55, 1960, 229-244. — 9. CHOPRA, S. L. - DALE, D. G.: Enteritis of early weaned pigs. I. Enteropathogenic *Escherichia coli*. = „Canad. J. comp. Med. Vet. Sci.“ 28, 1964, 239-247. — 10. KAUFFMANN, F.: Über neue thermolabile Körperantigene der Coli-Bakterien. = „Acta Pathol. Microbiol. Scand.“ 20, 1943, 21-44. — 11. KAUFFMANN, F.: The serology of the coli group. = „J. Immunol.“ 57, 1947, 71-100. — 12. KAUFFMANN, F. - PERCH BEATE: Über die Coliflora des gesunden Menschen. = „Acta Pathol. Microbiol. Scand.“ 20, 1943, 201-219. — 13. KIENITZ, M.: Klinische und bakteriologische Untersuchungen zum Problem der Colienteritis. = „Dtsch. med. Wschr.“ 90, 1965, 200-204. — 14. MANSSON, I.: Septic enteritis caused by haemolytic coliform bacteria. Proc. XVIth Int. vet. Congr. 2. Madrid, 1959, s. 529-530. — 15. MANSON, I.: Isolations of haemolytic *Escherichia coli* from diseased and healthy animals on a particular premises. = „Acta vet. Scand.“ 3, 1962, 163-173. — 16. MILER, I. - ŠTERZL, J. - KOSTKA, J. - LANC, A.: Effect of the intestinal flora on the development of specific and non-specific reactions in the new-born of different species. Proc. Symp. on Bacterial Endotoxins. New Jersey, 1963, s. 291-305. — 17. MÖHLMANN, H.: Verhütung von Infektionskrankheiten des Kalbes durch Kolostralmilch. = „Sitzungsber. dtsh. Akad. Landw.“ 12, 1963, 1-43. — 18. NORDBRING, F. - OLSSON, B.: Electrophoretic and immunological studies on sera of young pigs. I. Influence of ingestion of colostrum on protein pattern and antibody titre in sera from suckling pigs and the changes throughout lactation. = „Acta Soc. Med. Upsaliensis“ 62, 1957, 193-212. — 19. OCKLITZ, H. W.: Dyspepsiecoli. = „Dtsch. med. Wschr.“ 90, 1965, 214-219. — 20. OWEN, B. D. - BELL, J. M. - WILLIAMS, C. M. - OAKES, R. G.: Effect of porcine immune globulin administration on the survival and serum protein composition of colostrum-deprived pigs reared in a non isolated environment. = „Canad. J. Anim. Sci.“ 41, 1961, 236-252. — 21. PORTMANN, A.: Action des anticorps sur la croissance d'*Escherichia coli*. Presence de ces anticorps dans le lait de vache. = „Ann. Inst. Pasteur“ 103, 1962, 141-158. — 22. ROBERTS, H. E. - VALLELY, T. F.: An investigation into the relationship of haemolytic *Escherichia coli* to disease in pigs. = „Vet. Rec.“ 71, 1959, 846-850. — 23. SALAJKA, E.: A contribution to serology of *Esch. coli* as the originator of swine diseases. „Spisy přírodověd. fak. univ. Brno“, K28 „č. 438“, 1962, 510. — 24. SARWAR, M. - CAMPBELL, B. - PETERSEN, W. E.: Production of antibody in mammary gland of pregnant, non-lactating

and lactating cows, evoked by polyvalent antigen with reference to dosage and frequency of immunization. „Canad. J. comp. Med.“ 28, 1964, 183-192. — 25. SAUNDERS, C. N. - STEVENS, A. J. - SPENCE, J. B. - SOJKA, W. J.: Escherichia coli infection in piglets. = „Res. vet. Sci.“ 1, 1960, 28-35. — 26. SAUNDERS, C. N. - STEVENS, A. J. - SPENCE, J. B. - SOJKA, W. J.: Escherichia coli infection: reproduction of the disease in naturally-reared piglets. „Res. vet. Sci.“ 4, 1963, 333-346. — 27. SAUNDERS, C. N. - STEVENS, A. J. - SPENCE, J. B. - BETTS, A. O.: Escherichia coli infection: reproduction of the disease in „pathogen-free“ piglets. = „Res. vet. Sci.“ 4, 1963, 347-357. — 28. SEDLÁK, J. - RISCHÉ, H.: Enterobacteriaceae Infektionen. Leipzig, VEB Georg Thieme 1961, s. 480. — 29. SCHOENAERS, F. - KAECKENBEECK, A.: Etudes sur la colibacillose du veau. V. Immunoprophylaxie expérimentale. = „Annals Méd. Vét.“ 108, 1964, 3-11. — 30. SOJKA, W. J. - ERSKINE, R. G. - LLOYD, M. K.: Haemolytic Esch. coli and „edema disease“ of pigs. = „Vet. Rec.“ 69, 1957, 293-301. — 31. SOJKA, W. J. - LLOYD, M. K. - SWEENEY, E. J.: Escherichia coli serotypes associated with certain pig diseases. = „Res. vet. Sci.“ 1, 1960, 17-27. — 32. WAGNER, V.: Základy imunologie. Praha, SZN 1959. — 33. WESTPHAL, O.: Pyrogens. In: Polysaccharides in Biology. New York, G. F. Springer 1957, s. 115-220. — 34. WITTIG, W.: Untersuchungen über das Vorkommen verschiedener Escherichia coli-Serogruppen bei der Coli-Enterotoxemie des Schweines. „Arch. exp. Vet. Med.“ 17, 1963, 461-482.

К вопросу проблематики escherichios (колиинфекций) у поросят в ранний период после рождения

Проводилось серологическое обследование. О-антигенов у 1045 штаммов Escherichia coli, взятых у 659 поросят, заболевших поносом вскоре после рождения. На основе наиболее часто встречающихся О-антигенов можно штаммы E. coli с О-антигенами 08, 0141, 0101, 09, 02, 0138, 020 и 0117 считать патогенными или же подозревать их в патогенности у поросят в ранний период после рождения.

Некоторые приведенные О-антигены были специфическими только в определенных свиноматках.

Путем серологического обследования свиноматок с энзоотическим диагнозом колиентеритов и свиноматок из здоровых стад была установлена зависимость между заболеванием поросят и состоянием иммунитета матерей. В стадах с массовым появлением поносов поросят у свиноматок был установлен недостаток агглютининов против К-антигена специфического для данной среды серотипа E. coli.

On the Problem of Escherichioses (Coli-Infections) in Piglings in the Early Post-Natal Period

A serological investigation was carried out of O-antigens in 1045 strains of Escherichia coli from 659 piglings suffering from diarrhoea soon after birth. On the basis of the most frequent of O-antigens it is possible to consider E. coli strains with the O-antigens 08, 0141, 0101, 09, 02, 0138, 020, and 0117 as pathogenic or as suspicious of pathogeneity for piglings in the early post-natal period.

In the case of some of the mentioned O-antigens a specific occurrence in sties was ascertained.

Serological investigation of sows of herds with an enzootic occurrence of colienteritis and of sows of healthy herds revealed a connection between the occurrence of diseases of piglings and the state of immunity of the mothers. In herds with a mass occurrence of diarrhoea of piglings a lack of agglutinins against the K-antigen of the sty-specific serotype of E. coli was found in the sows.

Beitrag zur Problematik der Escherichiosen (Coliinfektionen) bei Ferkeln während des frühen postnatalen Zeitraumes

Eine serologische Untersuchung der O-Antigene bei 1045 Stämmen der Escherichia coli von 659 Stück Ferkeln, die bald nach der Geburt an Durchfällen erkrankten, wurde vorgenommen. Auf Grund des öftesten Vorkommens von O-Antigenen

kann man Stämme der *E. coli* mit O-Antigenen 08, 0141, 0101, 09, 02, 0138, 020 und 0117 für pathogen oder pathogen-verdächtig für Ferkel während des frühen postnatalen Zeitraumes halten.

Bei einigen von den angeführten O-Antigenen konnte ein für den Stall spezifisches Vorkommen festgestellt werden.

Durch die serologische Untersuchung der Sauen in Zuchten mit enzootischem Vorkommen von Colienteritiden und der Sauen in einer gesunden Zucht wurde ein Zusammenhang des Vorkommens der Ferkel-Erkrankung mit dem Immunitätszustand der Mütter ermittelt. In Zuchten mit einem massenartigen Vorkommen von Durchfall-Erkrankungen bei Ferkeln wurde bei den Sauen ein Mangel an Agglutininen gegen das K-Antigen des stallspezifischen Serotypes *E. coli* festgestellt.

Adresa autora:

MVDr. Eduard Salajka, Výzkumný ústav veterinárního lékařství, Brno-Medlánky

■ V boji proti slintavce zaujímá přední místo aktivní imunizace vnímavých zvířat. Přestože se v posledních letech soustřeďuje pozornost výzkumu na problematiku živých očkovacích látek, je věnováno nemálo úsilí dalšímu vývoji a zdokonalování inaktivovaných vakcin proti slintavce.

S modernizací způsobů výroby viru se změnily zdroje virového materiálu, které z výroby na živém skotu přecházejí na průmyslovou výrobu viru *in vitro* na přežívajících tkáních a tkáňových kulturách, které jsou ekonomicky podstatně výhodnější, efektivnější a produktivnější.

Při používání virových materiálů z tkáňových kultur vyvstala záhy otázka účinnosti takto vyrobených vakcin. Původní velmi optimistická očekávání se ukázala neopodstatněnými a zatím je nutno konstatovat, že dosud neexistuje inaktivovaná vakcína z viru kultivovaného *in vitro*, která by se v síle a zvláště pak v délce vytvořené imunity zcela vyrovnala vakcínám s obsahem viru ze živého skotu.

V našich podmínkách se s problematikou vakcin připravených z viru kultivovaného *in vitro* zabýváme od r. 1962. Zvláště aktuální se stala tato otázka v době výskytu slintavky typu C a v době zvýšeného nebezpečí zavlečení exotických typů viru slak na naše území. V těchto případech je totiž produkce viru na živém skotu nevýhodná jednak pro určité riziko rozvlečení nákazy a jednak pro relativně omezenou výrobní kapacitu výrobního podniku. Výroba příslušného typu viru *in vitro* je ideálním způsobem řešení, a to jak po stránce bezpečnosti provozu, tak i po stránce potřebné kapacity a rychlosti produkce. Byli jsme si vědomi toho, že v tomto případě nepůjde o vakcinu, která by mohla plnit úlohu očkovací látky pro velké preventivní akce. Vyvíjená vakcína měla sloužit právě pro případy náhlých vzniků onemocnění takovými typy nebo kmeny slak, proti nimž se nepřipravuje obchodní protislintavková vakcína. Perspektivně jsme počítali se zajištěním imunity alespoň na 3 měsíce, kterou by bylo možno v případě potřeby prodloužit revakcinačním zásahem.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Příprava a prověřování účinnosti vakcin proti slintavce z virů kultivovaných *in vitro* byly studovány mnohými autory. Ne zcela vyhovující síla a zvláště pak délka vytvářené imunity byla řešena různými způsoby. Zvyšovala se koncentrace virového materiálu ve vakcíně, sledovala se otázka možných změn vlastností viru

slak při pasážích na tkáňových kulturách, omezovaly se počty pasáží a hledaly se nejvýhodnější tkáňové substráty, na nichž by si virus uchovával své původní výhodné vlastnosti.

Vedle těchto způsobů se stalo velmi sledovaným řešením zvyšování účinku vakcín pomocí látek s adjuvančními vlastnostmi, které stimulují organismus zvířat k vyšší tvorbě imunity. Jedním z nejvíce používaných adjuvancií ve vakcíně proti slintavce se stal saponin.

Účinnost saponinových vakcín proti slintavce byla zkoušena řadou autorů již od r. 1951 [Espinat R. G. (1951), Petermann H. G. a spol. (1958), Mackowiak C. a spol. (1959a, 1959b, 1960, 1964), Olechnowitz A. F. (1961, 1962), Schneider B. a spol. (1963, 1964), van Bekkum J. G. a spol. (1963), Poul J. a spol. (1964), Strobbe R. a spol. (1964), Gilbert H. a spol. (1964), Amighi M. (1964) a jiní].

Je možno konstatovat, že ve všech dostupných pracích je registrován pozitivní účinek saponinu při aktivní imunizaci skotu i prasat. Výjimkou jsou pouze práce Olechnowitz, které udávají negativní výsledky účinku saponinu na sílu a zvláště pak délku vytvořené imunity u morčat i skotu.

V důsledku závažného úkolu rychlé výroby vakciny proti slintavce typu C jsme přistoupili k ověření a vývoji saponinové vakciny proti slintavce z viru kultivovaného *in vitro* v našich podmínkách.

MATERIÁL A METODIKA

1. Příprava vakciny. Pro přípravu pokusné saponinové monovalentní vakciny byly použity výrobní kmeny typu O a A, kultivované jednak na přezívajících sliznicích hovězích jazyků podle metodiky Frenkelovy [Hubík R. (1965)] a jednak na monolayerech primárních telecích ledvinových buněk. Pro přípravu vakciny byl používán pouze materiál, který dosáhl minimálně TCID₅₀ 10^{6,0}/1 ml nebo LD₅₀ 10^{6,0}/0,03 ml na sajících myškách a který byl výrazně pozitivní v KF testu.

Virus ze sliznice hovězích jazyků byl extrahován do destilované vody, virus z tkáňových kultur byl použit jako infekční zachovné medium. Virová suspenze nebo medium bylo po odstředění částečně vyčištěno pomocí chloroformu, znovu odstředěno a přefiltrováno přes filtr Seitz EKS do sterilního hydroxydu hlinitého. Po doplnění příslušného množství fosfátového pufru byl k vakcíně přidán sterilní roztok saponinu do konečné koncentrace 0,25 %. Inaktivace hotové vakciny byla provedena formalinem (0,05 %) při teplotě 25° C po dobu 24 hodin.

2. Zkoušení vakciny. Neškodnost vakciny byla zkoušena podle československé státní normy na vakcinu proti slak obchodní. Účinnost byla testována na mladém plně vnímavém skotu o průměrné váze 400 kg. Vakciny byly vyhodnocovány podle těchto hledisek:

- stanovení 50 % protekční dávky podle metody Hendersona W. M. a spol. (1953) s umělou infekcí za 3 týdny po vakcinaci;
- určení délky vytvořené imunity umělou infekcí skotu za 2, 3, 4 a 5 měsíců po vakcinaci;
- sledování tvorby seroneutralizačních protilátek za různou dobu po vakcinaci

VÝSLEDKY PRACÍ

Připravili jsme a prověřili 3 operační čísla pokusných saponinových vakcín. Každá vakcína byla nejdříve ověřena na neškodnost na skotu. Bylo zjištěno, že žádná nevyvolala tvorbu specifických změn v místech vpichu vakciny do jazyku

ani na ostatních predilekčních místech organismu. Rovněž tak lokální změny v místě aplikace vakciny do podkoží byly shodné s lokálními reakcemi po hydroxydové vakcině bez saponinu.

MONOVALENTNÍ VAKCINA TYPU A, OP. Č. VI/62

Tato vakcína byla připravena z viru typu A, kultivovaného na přežívajících primárních hovězích jazycích (Frenkelova metoda). Virový materiál představoval 15. postupnou pasáž na tomto typu kultury. Infekční titr viru na sajících myškách měl hodnotu $LD_{50} 10^{-7,0}/0,03$ ml.

Účinnost vakciny byla ověřena na 68 kusech skotu. Titrace 50% protekční dávky byla provedena ve 3 samostatných pokusech. Propočtem byla stanovena $PD_{50} = 0,3$ ml.

Účinnost této vakciny byla dále prověřena na 20 kusech skotu, vakcinovaných dávkou 0,5 ml, za 1 a 3 měsíce po vakcinaci. Za 3 měsíce po vakcinaci onemocněl generalizovaně 1 kus z 5 vakcinovaných dávkou 0,5 ml. Všechna zvířata za 1 měsíc a zvířata vakcinovaná dávkou 5 ml za 3 měsíce byla plně imunní.

DÁVKA	KUSY VAKCINOVANÉ				
	1	2	3	4	5
1,25 ml	■	■	■	■	■
2,5 ml	■	■			
5,0 ml					
10,0 ml					
KONTROLY	■	■	■		

1. Stanovení PD_{50} u vakciny op. č. IX/62

MONOVALENTNÍ VAKCINA TYPU O, OP. Č. IX/62

Tato vakcína byla vyrobena z viru typu O, kultivovaného na tkáňových kulturách. Virus představoval 24. postupnou pasáž viru na tomto typu kultury. Infekční titr dosáhl hodnoty $TCID_{50} 10^{-6,0}/0,1$ ml. Tato vakcína byla prověřena v krátkodobém testu na 20 kusech skotu. Skupiny zvířat po 5 kusech byly vakcinovány dávkami 1,25 ml, 2,5 ml, 5 ml a 10 ml. Ve skupině 1,25 ml onemocněla po čelenžové infekci za 3 týdny p. v. všechna vakcinovaná zvířata, ve skupině 2,5 ml onemocněly 2 kusy. Dávka 5 ml a 10 ml dala všem zvířatům plnou imunitu. Propočtem PD_{50} dal hodnotu 2,2 ml. (Viz tab. 1.)

MONOVALENTNÍ VAKCINA TYPU A, OP. Č. III/64

Tato vakcína byla vyrobena z viru typu A, kultivovaného na tkáňových kulturách primárních telecích ledvinových buněk. Virové medium představovalo 28. pasáž viru na tomto typu kultury. Infekční titr dosáhl hodnoty $TCID_{50} 10^{-6,0}/0,1$ ml a v KF testu bylo medium pozitivní ještě se 6% komplementem na + + + +.

Účinnost byla detailně prověřena jak v krátkodobém tak i dlouhodobém testu. S touto vakcinou byl rovněž proveden revakcinační pokus.

50% protekční dávka byla určena na 19 kusech skotu. Dávka 1,25 ml vytvořila úplnou imunitu u 1 kusu, 2 kusy byly částečně imunní a 1 kus onemocněl generalizovaně. Ostatní dávky vytvořily u vakcinovaných kusů úplnou imunitu. Propočtem byla stanovena PD_{50} na 1,25 ml (tab. II). Vyšetřením sér se ukázalo, že u všech vakcinovaných zvířat došlo k signifikantnímu vzestupu SN-protilátek.

Dávka 5 ml této vakciny byla ověřena na 20 kusech skotu v dlouhodobém pokusu. 4 skupiny zvířat po 5 kusech byly prověřovány čelenžovou infekcí za 2, 3, 4 a 5 měsíců po vakcinaci. Všechna vakcinovaná zvířata získala plnou imunitu na celou dobu pokusu.

DÁVKA	KUSY VAKCINOVANÉ					Ø TITR. SN PROTILÁTEK
	1	2	3	4	5	
1,25 ml						1 : 3,8
2,5 ml						1 : 14,8
5,0 ml						1 : 11,6
10,0 ml						1 : 33,8
KONTROLY						

2. Stanovení PD₅₀ u vakciny op. č. III/64

 - ZVÍŘE PO ČELENŽI NEONEMOCNĚLO

 - ZVÍŘE PO ČELENŽI ONEMOCNĚLO LOKÁLNĚ

 - ZVÍŘE PO ČELENŽI ONEMOCNĚLO GENERALISOVANĚ

Vyšetřením sér těchto zvířat bylo zjištěno maximum protilátek za 2 měsíce p. v. Po této době začíná hladina protilátek poklesávat a kolem 5. měsíce p. v. se blíží již k nulovým hodnotám. Až do 3 měsíce p. v. lze však hodnotit obsah SN-protilátek v sérech vakcinovaných zvířat velmi příznivě (tab. III).

DOBA PO VAKCINACI	KUSY VAKCINOVANÉ					Ø TITR. SN PROTILÁTEK	KONTROLY			
	1	2	3	4	5		1	2	3	4
2 MĚSÍCE						1 : 152				
3 MĚSÍCE						1 : 82				
4 MĚSÍCE						1 : 60				
5 MĚSÍCŮ						1 : 16				

3. Průkaz imunity za 2 až 5 měsíců po vakcinaci vakcinou op. č. III/64

K orientačnímu ověření účinku revakcinačního zásahu byl proveden pokus na 20 kusech skotu. Revakcinace byla provedena stejnou dávkou jako základní vakcinace, tj. 5 ml sc. K průkazu nejvhodnějšího termínu revakcinace byly revakcinovány skupiny zvířat za 1, 2, 3 a 4 měsíce po vakcinaci. Efekt revakcinačního zásahu byl ověřován vždy za 3 týdny po revakcinaci čelenžovou infekcí a průkazem vzestupu SN-protilátek v krvi. (Tab. IV.)

Optimální doba pro revakcinační zásah je mezi 2–3 měsícem po základní vakcinaci. Revakcinace provedená v této době vyvolává až třicetinásobný vzestup SN-protilátek. Revakcinace za 1 měsíc po vakcinaci vyvolává vzestup protilátek asi sedminásobný, za 4 měsíce ještě dvanáctinásobný. Tyto termíny jsou tedy již méně vhodné.

DOBA PO 1. VAKCINACI	KUSY REVAKCINOVANÉ					Ø TITR. SN PROTIL.		KONTROLY		
	1	2	3	4	5	PŘED R.	PO R.	1	2	3
1 MĚSÍC						1 : 62	1 : 617	■	■	■
2 MĚSÍCE						1 : 59	1 : 1525	■	■	■
3 MĚSÍCE						1 : 57	1 : 1827	■	■	■
4 MĚSÍCE						1 : 40	1 : 513	■	■	■

4. Průkaz imunity po revakcinaci vakcinou op. č. III/64

DISKUSE

Saponinovým vakcínám proti slak se připisuje řada výhodných vlastností, které si zaslouží plně pozornosti a prověřování.

Hlavním významem saponinu je jeho vliv na zvýšení imunogenity vakciny. Tato skutečnost, experimentálně ověřená Girardem (1964) a Strobbeem (1964), je důležitá hlavně u vakcín vyráběných z viru slak kultivovaného *in vitro*. Pokud byl saponin použit u vakcín vyrobených z viru ze živého skotu, ukázala se možnost podstatného snížení vakcinačních dávek.

Zvláště výhodné vlastnosti se ukázaly při současném použití saponinu a hydroxydu hlinitého, k čemuž dala experimentální podklady práce Strobbeho a spol. (1964).

Saponinové vakciny byly ověřovány jako mono-, bi- i trivalentní s různými typy viru a jejich účinek se zkoušel na skotu, prasatech i morčatech. Můžeme konstatovat, že výjma práce Olechnowitz (1961, 1962) se setkáváme pouze s kladnými výsledky jak v síle, tak i v délce vytvořené imunity. Vezmeme-li v úvahu údaje Mackowiaka a spol. (1964) a dalších autorů o nestejné kvalitě různých preparátů saponinu a zvláště pak o nevhodnosti příliš čistých preparátů, pak si lze Olechnowitzovy negativní výsledky vysvětlit pravděpodobně tímto způsobem.

Při vývoji naší saponinové vakciny z viru kultivovaného *in vitro* jsme se držovali klasického výrobního schématu s příslušnými změnami v extrakci a filtraci viru. Virové medium bylo před vlastní filtrací čištěno chloroformem v dávkách, které nevylučují nutnost filtrace přes filtry Seitz EKS. Po filtraci byl virus adsorbován na hydroxyd hlinitý.

Koncentrace viru z Frenkelovy metody byla 6% (váhových) a z tkáňových kultur 10%. Podkladem pro tyto koncentrace viru ve vakcíně byly naše dřívější pokusné práce [Hubík (1963)] a dále pak záměrné prověřování těchto koncentrací viru pro další vývoj trivalentní vakciny.

Saponin jsme použili v koncentraci 0,25%, a to na základě literárních údajů a na základě zkušeností, které jsme získali při přípravě morčecích hyperimunních typových sér (Fedák — nepublikováno). Tuto otázku bude nutno stále sledovat s ohledem na původ saponinu a tím i na jeho nestejné vlastnosti. Zvolená koncentrace neutrálního saponinu, který jsme měli k dispozici, se ukázala pro tento druh vakciny jako vhodná a zcela neškodná při sc. aplikaci skotu. Rovněž tak je bez vlivu na adsorpci viru na hydroxyd hlinitý a nijak neovlivňuje inaktivační sílu formalinu.

Krátkodobé pokusy na skotu, které byly provedeny se 3 operačními čísly pokusných vakcín na 87 zvířatech, prokázaly jednoznačně dobrou imunogenní schopnost těchto vakcín. Vezmeme-li v úvahu průměrnou 50% protekční dávku, tj. 1,25 ml pro dospělý skot, pak obecně používaná trojnásobná dávka je na objemu 5 ml, což je pro vakcínu proti slintavce velmi výhodné a má reálnou perspektivu pro zavedení bivalentní i trivalentní vakciny tohoto typu. Rovněž tak je tato dávka v dobré relaci k podobným zahraničním výrobkům tohoto druhu.

Imunogenita naší saponinové vakciny byla dále prověřena dlouhodobými pokusy do 5 měsíců po vakcinaci. Ještě za 5 měsíců byla všechna zvířata chráněna před čelenžovou infekcí masivní dávkou viru z hovězích aftů.

Sérologické vyšetřování sér vakcinovaných zvířat plně potvrdilo výsledky protekčních testů. Je možno konstatovat, že imunita dosahuje vrcholu za 2 měsíce po vakcinaci. Po této době se obsah protilátek v séru zvířat snižuje a kolem 5. měsíce poklesává k negativním hodnotám.

Jednou z možností, jak podstatně zesílit a tím i pravděpodobně prodloužit vytvořenou imunitu, je revakcinační zásah. Podle výsledku pokusů je k provedení revakcinace nejvhodnější doba za 2—3 měsíce po první vakcinaci. Silný vzestup obsahu protilátek v sérech revakcinovaných zvířat svědčí o podstatném posílení vytvořené imunity.

Závěrem můžeme konstatovat, že naše monovalentní saponinová vakcína proti slintavce z viru kultivovaného *in vitro*, aplikovaná v dávkách 5 ml pro dospělé skot, poskytuje dobrou a spolehlivou imunitu na dobu 3 měsíců. Za 4—5 měsíců jsou vakcinovaná zvířata ještě odolná proti čelenžové infekci, avšak titr SN-protilátek má již klesající tendenci, takže nebude již možno pravděpodobně vyloučit případy lokálních onemocnění u určitého procenta vakcinovaných zvířat. S ohledem na princip používání této vakciny (jen k okružovým očkováním kolem vzniklých ložisek nákazy) lze považovat stávající účinnost za plně postačující.

V případě potřeby je doba 2—3 měsíců p. v. optimálním termínem k prodloužení imunity revakcinačním zásahem stejnou dávkou vakciny.

ZÁVĚR

1. Byla připravena inaktivovaná monovalentní saponinová vakcína z viru slintavky kultivovaného *in vitro*.

2. V krátkodobých pokusech byla určena 50% protekční dávka, která v průměru dosáhla hodnoty 1,25 ml pro dospělé skot.

3. V dávkách 5 ml *sc.* vytváří tato vakcína solidní imunitu u dospělého skotu na dobu 3 měsíců. Za 4—5 měsíců po vakcinaci byla zvířata imunní proti čelenžové infekci masivní dávkou viru, ale obsah SN protilátek v sérech vakcinovaných zvířat má již klesající tendenci.

4. Revakcinační zásah stejnou dávkou vakciny, provedený za 2—3 měsíce po první vakcinaci, podstatně zvyšuje obsah SN protilátek v sérech zvířat, čímž se imunita zesiluje a prodlužuje.

5. Technologie výroby této vakciny odstraňuje nutnost výroby viru na živém skotu, zvyšuje podstatně výrobní kapacitu podniku a výrazně zlevňuje výrobu.

6. Monovalentní vakcína tohoto druhu splňuje požadavky pro přípravu vakciny proti typu C nebo kterémukoliv jinému, zvl. exotickému, který se v ČSSR běžně nevyskytuje a proti němuž se neprovádí pravidelné preventivní očkování.

7. Získané výsledky jsou podkladem pro další vývoj trivalentní vakciny a pro řešení otázky aktivní imunizace prasat.

Došlo dne 30. 12. 1965

Literatura

1. AMIGHI M.: Préparation d'un vaccin antiaphteux concentré inactivé trivalent O-A-SAT 1 avec des virus de culture obtenus sur lignée cellulaire de rein de hamster BHK 21 de Macpherson et Stocker. = „Bull. OIE“, 1964, 61, 935-943. —
2. VAN BEKKUM J. G. - FRENKEL S. - NATHANS I.: Vakzination der Schweine gegen Maul- und Klauensuche. = „Tijdschr. Diergeneeskunde“, 1963, 88, 1936-1945. —
3. ESPINET R. G.: La vacuna antiaftosa saponizada a 2 cc subcutaneous sur características sus ventajas su comportamiento. = XVI Congr. Mund. Vet. Madrid, 1959, 415-416. —
4. GILBERT H. - AMIGHI M. - SANTUCCI J. - KOROUR A.: Production du vaccin contre le virus aphteux de type SAT et son contrôle à l'Institut National des Sérums et Vaccins Razi (Iran) au cours de l'année 1963-1964. = „Bull. OIE“, 1964, 61, 997-1001. —
5. HENDERSON W. M. - GALLOWAY I. A.: The use of culture virus in the preparation of FMD vaccine. = „J. Hyg.“, 1953, 51, 546-558. —
6. HUBÍK R.: XI. konference stálé komise pro slintavku při OIE. = „Veterinářství“, 1965, 15, 87-88. —
7. MACKOWIAK C. - LANG - FONTAINE J. - CAMAND R. - PETERMANN H. G.: Rapport sur le contrôle du vaccin antiaphteux. = 5, kon-

gres biol. standardisace, Jerusalem, 1959. — 8. MACKOWIAK C. - PETERMANN H. G. - CAMAND R. - LANG: Un vaccin anti-aphteux trivalent, saponiné, à volume réduit, préparé à partir du virus de culture. = „Bull. Acad. Vet.“ 1959, 32, 313-318. — 9. MACKOWIAK C. - LANG - FONTAINE J. - CAMAND R. - PETERMANN H. G.: Etude de la durée de l'immunité conférée par le vaccin antiaphteux = „Bull. OIE“, 1960, 53, 781-792. — 10. MACKOWIAK C. - PETERMANN H. G. - CAMAND R. - FONTAINE J.: Preparation of vaccin against FMD. = Rep. Meeting Res. Group Stant. Techn. Comm. FAO, Amsterdam, 1964, 11-21. — 11. OLECHNOWITZ A. F.: Saponin als Adjuvans in der MKS Vakzine. = „Arch. Exp. Vet. Med.“, 1961, 15, 471-472. — 12. OLECHNOWITZ A. F. - HEINIG A. - LUDWIG: Die Immunisierung von Meerschweinchen und Rindern gegen Maul- und Klauenseuche mit Saponin-vakzine. = „Arch. Exp. Vet. Med.“, 1962, 3, 433-444. — 13. PETERMANN H. G. - MACKOWIAK C. - CAMAND R. - LANG: Experimentation d'un vaccin trivalent concentré préparé avec le virus Frenkel. = Symp. int. virol. Lyon, 1958, 123-128. — 14. POUL J. - PRUNET P. - CAUCHY L.: Recherches sur la vaccination antiaphteuse du porc. = „Bull. OIE“, 1964, 61, 1233-1249. — 15. SCHNEIDER B. - BENGELSDORF H. J.: Immunisierung des Schweine gegen MKS mit Gewebekulturvirus-Saponin-vakzine. = „Dtsch. Med. Wochenschr.“, 1963, 17, 482-484. — 16. SCHNEIDER B. - JAEGER O. - BENGELSDORF H. J.: Durée de l'immunité et taux des anticorps déterminés chez les bovins par l'utilisation de vaccins antiaphteux adsorbés préparés du virus obtenu en culture tissulaire. = „Bull. OIE“, 1964, 61, 1013-1023. — 17. STROBBE R. - LEUNEN - MAMMERICK M. - DEBECQ J.: Valeur à long échéance du vaccin anti-aphteux adsorbé saponiné trivalent. = „Bull. OIE“, 1964, 61, 1059-1078.

Концентрированная сапониновая вакцина против ящура.

I. Производство и изучение эффективности одновалентной сапониновой вакцины против ящура

1. Из вируса ящура, культивированного *in vitro*, была приготовлена инактивированная одновалентная сапониновая вакцина.

2. В краткосрочных опытах определялась 50% защитная доза, достигшая в среднем величины 1,25 мл для взрослого крупного рогатого скота.

3. В дозе 5 мл при подкожном введении эта вакцина создает солидный иммунитет у крупного рогатого скота сроком на 3 месяца. Спустя 4—5 месяцев после вакцинирования, благодаря крупной дозе вируса, животные были иммунными против члениковой инфекции, но содержание SN антител в сыворотках вакцинированных животных проявляет уже нисходящую тенденцию.

4. Повторная вакцинация в такой же дозе вакцины спустя 2—3 месяца после первой вакцинации существенно увеличивает содержание SN антител в сыворотках, что укрепляет и продлевает иммунитет.

5. Технология производства этой вакцины устраняет необходимость производства вируса на живом крупном рогатом скоте, существенно увеличивает производственную мощность предприятия и существенно удешевляет производство.

6. Одновалентная вакцина такого вида удовлетворяет требованиям к приготовлению вакцины против типа С или любого иного, в особенности экзотического, который в СССР обычно не встречается и против которого не делается регулярной профилактической прививки.

7. Полученные результаты служат основой для дальнейшего развития трехвалентной вакцины и для решения вопроса активной иммунизации свиней.

A Concentrated Saponin Vaccine applied against the Foot-and-Mouth Disease

I. Production and Study of the Effectiveness of a Monovalent Saponin Vaccine against the Foot-and-Mouth Disease

1. An inactivated monovalent saponin vaccine was prepared from the virus of the foot-and-mouth disease cultivated *in vitro*.

2. In short-term experiments a 50 per cent protective dose was determined, which reached an average value of 1.25 ml for mature cattle.

3. Applied in doses of 5 ml this vaccine establishes a solid immunity in adult cattle for a period of 3 months. In 4—5 months after vaccination the animals were immune to a challenge infection with a massive dose of the virus, but the content of SN antibodies in the sera of vaccinated animals shows an already falling tendency.

4. Revaccination with an equal dose of the vaccine carried out 2—3 months after the first vaccination substantially raises the contents of SN antibodies in the sera of the animals, which strengthens and prolongs their immunity.

5. The technology of the production of this vaccine removes the need for a production of the virus in live cattle, it substantially increases the production capacity of the producing enterprise and markedly reduces production costs.

6. The monovalent vaccine of this kind meets the demand for a preparation of vaccines against the C type or any other type, particularly against exotic types, which do not occur currently in Czechoslovakia and against which no regular protective inoculation is carried out.

7. The results obtained serve as a basis for a further development of a trivalent vaccine and for the solving of the problem of an active immunization of pigs.

Die konzentrierte Saponin-Vakzine gegen die Maul- und Klauenseuche

I. Die Erzeugung und das Studium der Wirksamkeit der monovalenten Saponin-Vakzine gegen die Maul- und Klauenseuche

1. Eine inaktivierte monovalente Saponin-Vakzine aus dem in vitro kultivierten Maul- und Klauenseuchevirus wurde zubereitet.

2. Bei kurzfristigen Versuchen wurde eine 50%ige Protektionsdosis für erwachsene Rinder, die durchschnittlich einen Wert von 1,25 ml erreichte, bestimmt.

3. Bei Dosen von 5 ml se. bildet diese Vakzine bei erwachsenem Rind solide Immunität für eine Dauer von 3 Monaten. Nach 4—5 Monaten nach der Vakzination waren die Tiere immun gegen die Challenge-Infektion durch eine massive Virusdosis; der Gehalt an SN-Antikörpern in den Seren vakzinierter Tiere weist bereits eine sinkende Tendenz auf.

4. Der Revaktinationseingriff durch dieselbe Vakzinendosis, der nach 2—3 Monaten nach der ersten Vakzination vorgenommen wurde, erhöht wesentlich den Gehalt an SN-Antikörpern in den Seren der Tiere, wodurch die Immunität verstärkt und verlängert wird.

5. Die Technologie der Erzeugung dieser Vakzine beseitigt die Notwendigkeit der Erzeugung dieses Virus an lebenden Rindern, erhöht wesentlich die Produktionskapazität des Betriebes und verbilligt in beträchtlichem Maße die Erzeugung.

6. Die monovalente Vakzine dieser Art erfüllt die Anforderungen für die Zubereitung der Vakzine gegen den Typ C oder gegen den oder jenen, besonders exotischen Typ, der in der CSSR in der Regel nicht vorkommt und gegen den man eine regelmäßige Präventiv-Impfung nicht durchführt.

7. Die erzielten Ergebnisse bilden eine Unterlage für eine weitere Entwicklung von trivalenter Vakzine und für die Lösung der Frage der aktiven Immunisierung der Schweine.

Adresy autorů:

MVDr. Rudolf Hubík, MVDr. František Lázníčka, MVDr. Břetislav Barek, Bioveta, nár. podnik, Terezín

**PŘÍSPĚVEK KE STUDIU SPECIFICKÉ
KOLOSTRÁLNÍ IMUNITY U TELAT OD
KRAV VAKCÍNOVANÝCH PROTI
SLINTAVCE A KULHAVCE**

I. SDĚLENÍ – PRŮKAZ SERONEUTRALIZAČNÍCH
PROTILÁTEK

■ Na určitou chráněnost telat pocházejících od krav, které byly vakcinovány v době březosti proti Slak, upozornil již K ö b e v r. 1941, později S c h n e i d e r (1955) a S t o n e a D e l a y e (1960).

G r a v e s (1963) v USA podrobil exaktnímu, experimentálnímu studiu kolostrální imunitu u skotu z hlediska praktických protiepidemických opatření proti Slak. Zjistil, že protilátky jsou v kolostru obsaženy po dobu 8 dnů po porodu. Kolostrální imunita telat od krav vakcinovaných proti Slak trvá až 4 měsíce.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Podle G r a v e s e (1963) lze přenos kolostrálních protilátek u telat blokovat perorálním podáním proteinu nebo odstředěného mléka před prvním napitím kolostra. Touto otázkou se zabývali také S c h o e n e r s a K a e c k e n b e e c k (1964), kteří prověřovali u telat vliv předchozího nakrmení mlékem, vaječným bílkem a roztokem glukózy na resorpci protilátek proti *E. coli* z později podaného kolostra. Zjistili, že jejich podání snižovalo schopnost střeva pro resorpci protilátek z později podaného kolostra a také předchozí podání glukózy neprodlužovalo období resorpce sliznice střevní pro protilátky, obsažené v kolostru. Jejich závěry potvrdil i S t e c k (1962), který zjistil u telat krmených zpočátku kravským mlékem a později kolostrem do 25 hodin dobrou a do 48 hodin ještě slabou resorpci gama-globulinu. Ve stáří 48–72 hodin po narození nebyla však již telata schopna resorbovat prokazatelné množství gama-globulinu. Naproti tomu U l b r i c h (1965) zjistil resorpci značného množství protilátek z mleziva až 60 hodin po porodu i v těch případech, kdy bylo předem podané mlezivo prosté protilátek.

K podobným závěrům došel i G l u š k o v SSSR (1964).

V naší práci jsme se zaměřili na studium kolostrální imunity u telat vakcinovaných krav.

METODIKA

POKUSNÁ ZVÍŘATA

Do pokusu bylo zařazeno 42 dojnic. Většina krav a jalovic byla naposled vakcinována 18 měsíců před pokusnou vakcinací. Vlastní pokusná vakcinace

I. Specifické protilátky v séru krevním dojníc a jejich telat

Číslo krávy	Doba od vakcinace do porodu dnů	Titry protilátek v séru krevním		Titry protilátek v séru krevním telat v časových intervalech:												
		před očkováním	při porodu	před prvním napitím kolostra	po vypití kolostra za											
					2 hod.	6 hod.	12 hod.	24 hod.	48 hod.	72 hod.	7 dní	14 dní	21 dní	28 dní	2 měsíce	3 měsíce
11001	9	32	32	0	0	—	8	5,6	16	5,6	11,3	5,6	5,6	5,6	—	—
1298	10	22,6	16	—	45,2	—	64	116	16	90,5	97	24,2	64	—	—	—
9299	17	45,2	90,5	—	—	—	64	45,2	90,2	32	16	128	32	32	—	—
30	34	64	45,2	0	8	—	90,5	32	22,6	64	45,2	32	12,1	11,3	—	—
533	37	22,6	10,4	0	0	—	181	362	45,2	304,4	256	512	45,2	45	—	—
510	46	64	45,2	0	0	—	128	181	152,2	181	724,1	304,4	97	90,5	—	—
476	58	90,5	362	0	0	—	16	90,5	90,5	181	90,5	22,6	90,5	—	—	—
16428	75	32	64	—	16	—	64	76,1	45,2	32	22,6	—	38,05	22,6	—	—
487	102	256	512	0	—	—	22,6	256	16	90,5	32	181	32	16	9,5	0
805	110	0	32	—	—	—	45,2	5,6	0	32	8	8	16	22,6	0	0
507	111	256	512	0	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
465	129	181	181	0	0	—	0	32	8	32	16	5,6	16	11,3	0	0
15076	151	5,6	22,6	—	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
490	152	11,3	5,6	0	—	—	8	4	8	11,3	16	4	5,6	0	4	0
16061	161	4	11,3	0	—	—	0	4	0	0	0	0	0	0	0	0
524	169	4	32	0	—	—	0	0	0	4	4	5,6	4	0	0	0
8	173	5,6	19,3	0	—	—	8	—	8	12,3	5,6	5,6	4	0	4	0

481	178	0	0	—	—	—	5,6	0	5,6	5,6	0	0	4	4	0	0
526	184	5,6	16	—	—	—	5,3	22,6	9,5	4	0	64	16	0	8	—
10255	188	32	22,6	0	—	—	22,6	5,6	9,5	11,3	11,3	11,3	4	4	0	0
527	199	8	32	0	—	—	11,3	11,3	8	5,6	9,5	4	0	—	—	—
17847	203	11,3	5,6	—	—	11,3	22,6	19	12,1	22,6	16	—	4	4	0	0
						4	22,6	16	9,5	8	5,6	—	0	4	0	0
8113	204	11,3	45,2	—	—	—	0	0	0	0	0	—	—	—	—	—
497	204	0	45	0	—	—	23	38	—	—	11,3	—	11,3	8	5,6	—
35	226	0	0	—	—	0	0	0	—	—	0	0	0	0	0	0
15112	226	16	45,2	—	—	45,2	107,6	90,5	—	—	64	45,2	11,3	11,3	8	0
470	226	45,2	16	—	—	0	0	—	0	—	0	0	0	0	0	0
13	247	0	4	0	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
428	249	0	22,6	8	—	90,5	45,2	53,8	—	—	90,5	11,3	11,3	11,3	5,3	—
6911	250	0	0	0	—	0	0	0	—	—	0	0	0	0	0	—
16401	252	23	45	—	—	—	0	11,3	—	—	7	4	5,6	4	0	0
513	259	0	4	—	—	0	8	4	—	—	0	0	0	0	0	—
518	265	0	0	—	—	—	5,6	8	—	—	0	0	5,6	0	0	—
531	284	32	45	—	—	—	—	—	90	—	—	128	—	—	—	—
J 0748	288	0	10	—	—	—	—	—	0	—	—	0	—	—	—	—
53	291	16	96	—	—	—	—	—	4	—	—	0	—	—	0	—
J 11001	292	0	6	—	—	—	—	—	0	—	—	0	—	—	4	—
495	297	90	128	—	—	—	—	—	76	—	—	23	—	—	0	—
J 15112	339	16	16	—	—	—	—	—	—	—	9	4	—	0	—	—
20085	339	0	0	—	—	—	—	—	—	—	—	0	—	0	—	—
449	343	0	0	—	—	—	—	—	—	0	—	0	—	0	—	—

II. Specifické protilátky v séru krevním dojníc a jejich kolostru (mléku)

Číslo krávy	Doba od vakcinace do porodu dnů	Titř protilátek v séru krevním:		Titř protilátek v kolostru v jednotlivých intervalech po porodu											
		před očkováním	při porodu												
				hned po porodu	za 2 hod.	6 hod.	12 hod.	24 hod.	48 hod.	72 hod.	7 dní	14 dní	21 dní	28 dní	
11001	9	32	32	1448	624,1	—	256	90,5	90,5	16	0	4	0	0	
1298	10	22,6	16	—	64	—	11,3	8	4	0	0	0	0	—	
9299	17	45,2	90,5	—	—	—	181	90,5	8	5,6	0	0	0	0	
30	34	64	45,2	512	64	—	24,2	16	9,5	4	0	0	0	0	
533	37	22,6	10,24	4096	128	—	128	64	128	16	5,6	0	0	0	
510	46	64	45,2	362	256	—	90,5	45,2	32	16	4	8	0	0	
476	58	95	362	1448	512	—	1024	362	128	90,5	11,3	4	4	—	
532	64	32	256	90,5	32	—	32	64	16	0	0	0	0	0	
16428	75	32	64	—	32	—	76,1	90,5	64	76,1	45,2	22,6	0	0	
487	102	256	512	724,1	—	—	127,4	38	9,5	0	0	0	4	0	
805	110	0	32	—	—	—	5,6	4	0	0	0	0	0	0	
507	111	256	512	4096	—	—	90,5	32	32	19	0	4	8	0	
465	129	181	181	—	181	—	90,5	42,5	8	16	4	0	0	0	
15070	151	5,6	22,6	—	—	—	45,2	22,6	0	0	0	0	0	0	
490	152	11,2	5,6	90,5	—	—	8	—	0	0	0	0	0	0	
16061	161	4	11,3	32	—	—	0	4	0	0	0	0	0	0	
524	169	4	32	64	—	—	22,6	11,3	0	0	0	0	0	0	
8	173	5,6	19,3	22,6	—	—	22,6	0	0	0	0	0	0	0	
481	178	0	0	—	—	—	0	0	0	0	0	0	0	0	
526	184	5,6	16	—	—	—	64	4	0	0	0	0	0	0	
10255	188	32	22,6	181	—	—	11,3	11,3	0	0	0	0	0	0	
527	199	8	32	362	—	—	22,6	11,3	5,6	4	0	0	0	0	
17847	203	11,3	56	—	—	181	45,2	8	4	0	0	0	0	0	
8113	204	11,3	45,2	—	—	—	32	11,3	0	5,6	0	—	—	—	
497	204	0	45,2	304	—	—	53	64	0	0	0	0	0	0	
35	226	0	0	—	—	32	11,3	4	—	—	0	0	0	0	
15112	226	16	45,2	—	—	362	22,4	12,1	—	—	0	0	0	0	
470	226	45,2	16	—	—	16	—	8	—	—	0	0	0	0	
13	247	0	4	19,5	—	—	8	0	0	0	0	0	0	0	
428	249	0	22,6	16	—	24,7	8	5,7	—	—	0	0	0	0	
6911	250	0	0	16	—	0	0	0	—	—	0	0	0	0	
16401	252	23	45	—	—	—	256	16	—	—	0	0	0	0	
513	259	0	4	—	—	512	0	0	—	—	0	0	0	0	
518	265	0	0	—	—	—	5,6	4	—	—	0	0	0	0	

byla uskutečněna v květnu 1963 komerční adsorbátovou vakcínou proti Slak typu O a A v dávce 20 ml na kus.

SCHÉMA ODBĚRU KRVE

- a) U krav byla odebírána krev před pokusnou vakcinací a v den porodu.
- b) U telat byla odebírána krev před prvním napitím kolostra, potom za 2, 6, 12, 24, 48, 72 hodin, za 7, 14, 21, 28 dní a za 2 a 3 měsíce po prvním napití kolostra.
- c) Současně s odběrem krve u telat byly odebírány vzorky kolostra (mléka) u matek, a to ihned po porodu a potom v intervalech 2, 6, 12, 24, 48, 72 hodin, 7, 14, 21, 28 dní po porodu.

SEROLOGICKÉ VYŠETŘENÍ

Odstředěním získaná séra ze vzorků krve a mléka byla inaktivována při 56° C po dobu 30 minut až do vyšetření uložena při teplotě -30° C.

Všechny vzorky krevních sér i mléka krávy a jejího telete byly vyšetřovány na přítomnost virusneutralizačních protilátek vždy jednorázově na stejné sérii zkumavkových tkáňových kultur připravených z primárních telecích ledvinových buněk.

Virusneutralizační test byl prováděn v 1 ml systému. Při neutralizaci viru bylo použito stabilní dávky viru typu A (100 TKID₅₀/0,1 ml) a dvounásobného postupného ředění séra nebo mléka. Neutralizace probíhala při laboratorní teplotě po dobu 90 minut. Na 1 zkumavku s tkáňovou kulturou se přidávalo po 0,2 ml směsi viru a séra. Po 48 hod. inkubaci při 37° C se posuzoval cytopatogenní efekt a výpočet NI₅₀ podle Reeda a Muena.

VÝSLEDKY

Výsledky vyšetření virusneutralizačních protilátek v krvi a mlezivu dojníc po očkování adsorbátovou vakcínou proti slintavce i výsledky vyšetřování těchto protilátek v krevním séru telat jsou uvedeny v tabulkách I a II.

Při vyšetření krve virusneutralizačním testem od 42 krav před pokusnou vakcinací byly zjištěny u 29 dojníc v séru specifické protilátky a zbývajících 13 krav bylo bez prokazatelných protilátek.

Hladina specifických protilátek v kolostru u krav hned po porodu bývá ve většině případů průměrně o 3 ředění, výjimečně o 5 ředění vyšší než v jejich krevním séru (viz tab. II). Jen ojediněle je titr protilátek v kolostru nižší než v krevním séru. Titr protilátek po porodu v kolostru poměrně rychle klesá. U většiny krav jsou protilátky prokazatelné ještě za 3 dny po porodu a jen u některých krav byly zjišťovány ještě za 7 dní po porodu. Výjimečně u 1 krávy byly prokázány ještě 14 den po porodu.

Hladina protilátek v krevním séru telat se ve většině případů zvyšuje do 48 hodin od prvního napití kolostra a potom postupně klesá. Ze 43 telat zařazených do pokusu, u 10 telat, tj. 23,8 %, nebyly zjištěny protilátky po vypití kolostra. U 5 z nich bylo možno tento výsledek očekávat vzhledem k tomu, že ani jejich matky neměly protilátky v krvi a v mlezivu. Dojnice zbývajících 5 telat však měly protilátky v krvi před porodem, i v kolostru v dostatečném množství. U dalších 33 telat došlo k přestupu specifických protilátek z mleziva do séra telat. U 10 telat (23,8 %) byly protilátky prokázány do stáří 1 měsíce,

u 15 telat (34,8 %) byly zjištěny ještě ve stáří 1 měsíce a u 8 telat (18,6 %) ještě ve stáří 2 měsíců.

Ze srovnání hladiny protilátek v krevním séru a kolostru u matek hned po porodu a v krevním séru u telat v době, kdy dosahují nejvyššího titru protilátek vyplývá, že všechny 3 hodnoty bývají většinou v určitém vzájemném vztahu. Určité výšce protilátek v krevním séru matky odpovídá příslušné množství protilátek v kolostru a v krevním séru telete.

DISKUSE

Po pokusném očkování a při dalším prověřování hladiny virusneutralizačních protilátek u krav bylo zjištěno, že skoro u všech došlo k zvýšení titru protilátek, který byl v dosti úzkém vztahu k hladině protilátek před očkováním. U dojníc s vysokým titrem protilátek před vakcinací se imunobiologická reakce projevila jen nepatrným zvýšením hladiny virusneutralizačních protilátek. U většiny očkovaných krav byl zjištěn výraznější pokles protilátek již za půl roku po očkování, při čemž u 5 krav došlo do 1 roku k úplnému vymizení protilátek, u některých klesl titer na 4 nebo 6. Přesto u poloviny krav byl titer protilátek v průběhu 2. pololetí ještě stále vyšší než před očkováním.

Intenzitu koncentrace protilátek z krve dojníc do kolostra lze demonstrovat na příkladu průkazu protilátek u dojnice č. 35, u níž se běžnou vyšetřovací metodou v krvi již nepodařilo zjistit protilátky. V jejím kolostru však byly za 12 hodin prokázány protilátky v titru 1:32.

Při porovnání hladiny protilátek v krvi dojníc při porodu a v kolostru lze zjistit, že v kolostru může být až pětikrát vyšší titer protilátek. U některých krav však je koncentrace protilátek poměrně menší, nebo dokonce nedosáhne ani hladiny protilátek v krvi. Zdá se, že intenzita přechodu protilátek z krve do mleziva je závislá na časovém intervalu, mezi vakcinací a porodem. Čím je kratší tento interval, tím vyšší bývá titer protilátek v mlezivu ve srovnání s titrem v krevním séru a naopak. Vlivy, které působí na intenzitu prostupu protilátek z krve do mleziva jsme však v naší práci nestudovali.

V kolostru očkovaných krav se udržují protilátky až do 7 dnů, výjimečně u 1 krávy až do 14 dnů po porodu. U této krávy (č. 16428) byla 3 dny po porodu zjištěna akutní parenchymatózní mastitida, při které, jak je známo, se do mléčného sekretu dostává i krevní sérum. Tím lze také vysvětlit nález specifických protilátek v kolostru ještě 14 dní po porodu, tedy v době, kdy v mléčné žláze probíhal ještě zánětlivý proces.

Z kolostra matek přijímají protilátky telata, u kterých jsou výjimečně prokazatelné už za 2 hodiny, běžně byly zjišťovány při vyšetřování krve odebrané telatům za 6 hodin po prvním napití kolostru.

U matky telete č. 428, u kterého byl zjištěn titer specifických protilátek 1:8 ihned po porodu, trvala březost 306 dní a po porodu došlo k zadržení plodu, obalů. Lze předpokládat, že mohlo dojít během březosti vlivem zánětlivého procesu mezi klky kotyledonů a karunkulů k těsnějšímu spojení a tím k přechodu protilátek z matky na plod intrauterinní cestou. Tuto hypotézu však bude nutno ověřit dalším výzkumem. U všech ostatních telat se potvrdily poznatky mnoha autorů, že přenos specifických protilátek z matky na tele se neuskutečňuje intrauterinně, ale kolostrum.

Výška počátečního titru protilátek v krevním séru telat je závislá na množství protilátek v krvi dojníc. Dojnice dosahují vysokých titrů protilátek od 3 týdnů do 5 měsíců po vakcinaci. U krav opakovaně vakcinovaných jsme zjistili v některých případech dostatečně vysoký titer protilátek i za 12 měsíců po vakcinaci. Z toho vyplývá, že je nejvhodnější vakcinovat krávy proti Slak od 4 měsíců březosti do 3 týdnů před porodem. To se hlavně vztahuje na březí jalovice, u kterých v převážné většině jde o prvou vakcinaci. U starších krav, kde se provádí pravidelně jednou ročně vakcinace se tento časový interval od vakcinace do porodu může prodloužit. Zajímavý je nález u pěti telat, u nichž nebyly zjištěny žádné specifické kolostrální protilátky v krevním séru od prvního napití kolostru až do stáří 2 měsíců po porodu, i když hladina protilátek v krevním séru i v kolostru u matek byla dostatečně vysoká. Při našem studiu jsme příčinu tohoto stavu neobjasnili. Nabízí se vysvětlení

Graves (1963), který zjistil, že lze přenos kolostrálních protilátek u telat blokovat perorálním podáním proteinu nebo odstředěného mléka. Jiní autoři však tuto možnost nepotvrzují (Schoenaers a Kaeckenbeeck 1964, Steck 1962 aj.). I v našich pokusech mohlo k takové situaci, kterou uvádí Graves dojít, poněvadž v hospodářství se telata po narození uvazují u žlabu mezi dojnice.

ZÁVĚR

Přenos imunity z dojnice kolostrem na tele při slintavce byl sledován u 42 krav a 43 telat. Bylo zjištěno, že u krav po vakcinaci adsorbátovou vakcínou v dávce 20 ml došlo ke zvýšení hladiny virusneutralizačních protilátek, které se ve většině případů udržovaly až po dobu 1 roku.

Hladina specifických protilátek v kolostru ihned po porodu je zpravidla vyšší než v krevním séru dojnice. V kolostru očkovanych krav se udržují specifické protilátky až do 7 dnů po porodu.

Dojnice předávají protilátky telatům jen kolostrem. V krvi telat jsou prozkatelné až za 2 hodiny nebo krátce po této době od prvního napití kolostra. Perzistence protilátek v krvi telat je závislá na počáteční výšce titru v jejich krevním séru. Při počáteční vysoké hladině protilátek v krvi telat se udržuje kolostrální imunita déle než při počáteční nízké hladině protilátek.

Došlo dne 30. 12. 1965

Literatura

GLUŠKO, B. G.: Dynamika titra antitěl u novorozených telat při jaščure. = „Veterinarija“ 41, 1964, s. 20-22. — GRAVES, J. H.: Transfer of Neutralizing Antibody by Colostrum to Calves Born of Foot-and-Mouth Disease Vaccinated Dams. = „J. Immunol.“ 91, 1963, s. 251-256. — KÖBE, K.: Ergebnisse und Probleme zur Klärung des Immunisierungsvorganges nach der aktiven Schutzimpfung gegen Maul- und Klauenseuche. = „Dtsch. tierärzthl. Wschr.“ 49, 1941, s. 13-37. — SCHNEIDER, B.: Zur Übertragung der Maul- und Klauenseuche-Antikörper vom Muttertier auf das neugeborene Kalb. = „Monatsch. Tierheilk.“ 7, 1955, s. 137-143. — SCHOENERS, F. - KAECKENBEECK, A.: Influence de l'ingestion préalable de protéines ou de glucose sur la résorption des anticorps du colostrum, chez le veau nouveau-né. = „Ann. Méd. vet.“ 108, 1964, s. 205-211. — STECK, F. Th.: Die Übertragung von Gamaglobulin auf das Neugeborene Kalb mit dem Colostrum. = „Schweiz. Arch. Tierhk.“ 104, 1962, s. 525-536. — STONE, S. S. - DELAY, P. D.: Serum and Colostral Antibody Levels in Cattle Convalescent from Foot-and-Mouth Disease: Test in Calves and Fetal Tissue. = „J. Immunol.“ 84, 1960, s. 458-462. — ULBRICH, R.: Die passive Immunität des Jungtiers und ihre Bedeutung für die Krankheitsverhütung. = „Dtsch. tierärzthl. Wschr.“ 72, 1965, s. 80-85.

К вопросу исследования специфического молозивного иммунитета у телят от вакцинированных против ящура коров

Передача иммунитета с коровы на теленка посредством молозива при ящуре изучалась у 42 коров и 43 телят. Было установлено, что у коров после вакцинирования адсорбатной вакциной в дозе 20 мл повысился уровень вируснейтрализационных антител, которые в большинстве случаев сохранялись в течение 1 года.

Уровень специфических антител в молозиве сразу же после отела, как правило, бывает выше, чем в кровяной сыворотке дойных коров. В молозиве вакцинированных коров специфические антитела сохраняются в течение 7 дней после отела.

Коровы передают телятам антитела лишь посредством молозива. В крови телят антитела достоверно установим только спустя 2 часа или немного позже после первого питья молозива. Стойкость антител в крови телят зависит от начальной высоты титра в их кровяной сыворотке. При высоком начальном уровне антител в крови телят молозивный иммунитет сохраняется дольше, чем при начальном низком уровне антител.

On the Study of Specific Colostral Immunity of Calves of Cows that had been Vaccinated against the Foot-and-Mouth Disease

The transmission of immunity from cows by way of the colostrum to calves in the case of the foot-and-mouth disease was studied in 42 cows and 34 calves. It was found that after a vaccination of cows with a dose of 20 ml of adsorbate vaccine there occurred a rising of the level of virus-neutralizing antibodies, which, in a majority of cases, were maintained for up to one year.

The level of specific antibodies in the colostrum immediately after parturition is as a rule higher than in the blood serum of milch-cows. In the colostrum of inoculated cows the specific antibodies are maintained for up to 7 days after parturition.

Milch-cows transmit antibodies to calves only by way of the colostrum. In the blood of calves they can be proved not earlier than after 2 hours or shortly after this time following the first drinking of colostrum. The persistence of antibodies in the blood of calves depends on the initial height of the titre in their blood serum. In the case of a high initial level of antibodies in the blood of calves colostrum immunity persists longer than in the case of a low initial level of antibodies.

Beitrag zum Studium der spezifischen Kolostral-Immunität bei Kälbern und Kühen, die gegen die Maul- und Klauenseuche vakziniert wurden

Die Übertragung der Immunität von der Kuh auf das Kalb durch das Kolostrum bei der Maul- und Klauenseuche wurde bei 42 Kühen und 43 Kälbern beobachtet. Man stellte fest, daß bei Kühen nach der Vakzination mittels der Adsorbat-Vakzine in einer Dosis von 20 ml eine Erhöhung des Niveaus der virusneutralisierenden Antikörper, die in der Mehrheit der Fälle bis ein Jahr erhalten blieben, eintrat.

Das Niveau der spezifischen Antikörper im Kolostrum unmittelbar nach dem Abkalben ist in der Regel höher als im Blutserum der Milchkühe. Die spezifischen Antikörper bleiben im Kolostrum der geimpften Kühe bis zu 7 Tagen nach dem Abkalben erhalten.

Die Milchkühe übertragen die Antikörper auf Kälber nur durch das Kolostrum. Im Blut der Kälber sind sie erst nach 2 Stunden oder kurz nach dieser Zeit von der ersten Aufnahme von Kolostrum nachweisbar. Die Persistenz der Antikörper im Blut der Kälber ist von der anfänglichen Titerhöhe in ihrem Blutserum abhängig. Bei einem anfänglichen hohen Antikörper-Niveau im Blut der Kälber bleibt die Kolostral-Immunität länger erhalten als bei anfänglichem niedrigen Antikörper-Niveau.

Adresy autorů:

MVDr. Bohumil Šrubař, veterinární fakulta VŠZ, Brno, Palackého 1—3,
MVDr. Marie Jiranová, Bioveta, n. p., Terezín

■ Červenkové zárodky vakcinačního kmene WR 2 dispergují u myší během několika dní z místa inokulace do jednotlivých orgánů. Rozšíření zárodků v celém organismu je jednou z hlavních podmínek pro vytvoření odolnosti proti následné vyvolávající infekci (Žák 1965). Dalo se proto očekávat, že když se jakýmkoliv způsobem urychlí rozšíření zárodků do organismu, zkrátí se i doba mezi očkováním a nástupem chráněnosti.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Při vyhledávání způsobu, jak tohoto urychlení dosáhnout, bylo třeba brát v úvahu jeho použitelnost v praxi. Nejrychlejší rozptyl inokula do celého organismu zaručuje intravenózní aplikace, která však při hromadných očkovacích akcích nepřichází v úvahu. Intraperitoneální způsob očkování, blízký co do rychlosti rozsevu inokula aplikaci *i. v.*, je v rutinní praxi sice možný, nicméně pro riziko poranění orgánů dutiny břišní také nepřijatelný. Ostatní v praxi použitelné způsoby parenterální aplikace v porovnání se *s. c.* podáním nezaručují urychlení disperze inokula do organismu.

V klinické praxi, především humánní, se používá k zrychlení rozptylu léků, antibiotik, anestetik a diagnostických preparátů z místa inokulace ferment hyaluronidáza, popsáný poprvé Durant—Reynalsem (1928) (Chain a Duthie 1939, 1940, Gibian 1951, Gebauer 1963, Aderhold 1954, Freisleder a Schweier 1957, Žák 1957, Bank 1958, Rembez 1962 a řada dalších). Zvýšení permeability tkání, vyvolané hyaluronidázou, spočívá v hydrolýze vysokoviskózní hyaluronové kyseliny intracelulární substance mezodermu.

Někteří autoři použili hyaluronidázu i k urychlení resorpce preparátů, sloužících k specifické prevenci. Berman (1947) referuje o příznivém vlivu na imunizační efekt cholerové, [Kudrjaceva (1950) a Trius a Jaščenko (1953)] BCG vakcíny. Při simultánní aplikaci s hyaluronidázou zaznamenal Alaverdjan (1962) zvýšení imunogenity tetravakcíny (*Salmonella paratyphi* A, *S. paratyphi* B, *Shigella flexneri*, *Sh. sonnei*) a Lenfeld a spol. (1956) příznivější léčebný účinek tetanového antitoxinu. Möhlmann a spol. (1956) dosáhli při terapii červenkové infekce homologním sérem a penicilínem v kombinaci s hyaluronidázou stejný a v některých případech dokonce i lepší terapeutický účinek při jejich subkutánní aplikaci než po intravenózní aplikaci těchto preparátů bez hyaluronidázy.

Bylo proto možné očekávat, že hyaluronidáza příznivě ovlivní i pronikání červenkových zárodků do organismu a urychlí tím nástup imunity.

MATERIAL A METODY

Vakcína: 48hodinová kultura kmene WR 2, získaná statickou kultivací v kazeinhydrolyzátovém médiu (KH médium) s 10 % pepticky tráveného koňského séra. Konečné pH kultivačního média bylo 7,6.

Hyaluronidáza: Komerční preparát Ústavu sér a očkovacích látek Praha. Lyofilizovaný enzym z býčích varlat s přidavkem chloridu sodného, rozpuštěný v ampulkách po 1 mg.

Pokusná zvířata: Albinotické myši obojího pohlaví, průměrné váhy 16 až 18 g, aklimatizované 14 dní na ústavní podmínky.

Při izolaci zárodků z jednotlivých orgánů a vyvolávající infekci jsme postupovali stejným způsobem, jaký popisujeme v předcházející práci (Žák 1965).

VÝSLEDKY

Po ověření, že hyaluronizáda není pro myši toxická a neovlivňuje množení červenkových zárodků, zjišťovali jsme v předběžném pokusu, zda v směsi s kulturou nemá za následek změnu virulence a imunogenity zárodků kmene WR 2.

K 48hodinové kultuře, obsahující 2×10^9 živých zárodků v 1 ml, nezředěné a zředěné KH médiem v poměru 10^{-1} a 10^{-2} , jsme bezprostředně před očkováním přidali hyaluronidázu v množství 1,0, 2,0, 3,0, 4,0 a 5,0 mg na 1 ml. Jedna dávka pro myš v množství 0,2 ml tak obsahovala 4×10^8 , 4×10^7 resp. 4×10^6 živých zárodků a 0,2 až 1,0 mg hyaluronidázy. Každým vzorkem jsme očkovali po 20 myších s. c. Dalším skupinám po 20 myších, jež sloužily jako kontrolní, jsme s. c. a i. perit. inokulovali stejná ředění vakcín, avšak bez hyaluronidázy. Ve všech pokusných skupinách myši jsme po 14 dní sledovali hynutí, pak jsme všechny myši, které přežily, spolu s 10 nevakcinovanými, podrobili vyvolávající infekci a její výsledek sledovali dalších 11 dní. Z tab. I, v níž je uvedeno hynutí myši po vakcinaci i po infekci, je zřejmé, že nejsou průkazné rozdíly v hynutí myši očkovaných s. c. kulturou s hyaluronizádou v porovnání s hynutím myši očkovaných s. c. resp. i. perit. samotnou kulturou. U všech očkovaných myši se do 14 dní vyvinula solidní imunita; vyvolávající infekci, již do 4. dne podlehlly všechny myši nevakcinované, přežily všechny vakcinované myši bez ohledu na způsob očkování.

Po získání těchto příznivých výsledků jsme přikročili k vlastnímu studiu vlivu hyaluronidázy na rychlost disperze červenkových zárodků do jednotlivých orgánů myši a na nástup imunity. K vakcinaci jsme použili 48hodinovou kulturu kmene WR 2 s počtem $4-6 \times 10^9$ živých zárodků v 1 ml, kterou jsme inokulovali 240 myším s. c. v dávce 0,2 ml spolu s 0,2 mg hyaluronidázy. Ke kontrolním účelům jsme stejnou dávku vakciny, avšak bez hyaluronidázy, aplikovali 240 myším i. perit. a 120 myším s. c. Ze skupiny myši očkovaných vakcinou s hyaluronidázou a z kontrolní skupiny očkované i. perit. jsme do 10. dne každý den a pak 15. a 20. den po vakcinaci usmrcovali po 10 myších a jejich orgány vyšetřovali na přítomnost červenkových zárodků. K izolačním pokusům jsme sterilně odebírali srdce, 1 lalok plic, $\frac{1}{3}$ jater, ledvinu, slezinu, stehenní kost, část gluteálního svalstva, močový měchýř a mozek a u myši očkovaných vakcinou s hyaluronidázou s. c. i podkoží v místě inokulace. Ukázalo se, že rychlost disperze zárodků do organismu je po subkutánní aplikaci vakciny s hyaluronidázou přibližně stejná jako po i. perit. podání bez hyaluronidázy (tab. II). Červenkové zárodky byly izolovány z velké většiny orgánů všech myši již za 48 případně 72 hodin po vakcinaci. Jen v mozku — s výjimkou 2 případů — nebyly zárodky zjištěny po celou pozorovací dobu. V místě inokulace se po s. c. aplikaci vakciny s hyaluronidázou zjišťovaly zárodky pravidelně jen do 3. dne. Počínaje 5. dnem se izolace z podkoží zdařila nejvýše u 20 % myši. Do 20. dne byl zaznamenán zřetelný pokles počtu pozitivních izolací z jater, svalů a močového měchýře

I. Vliv *i. perit.* aplikace a hyaluronidázy na virulenci a imunogenitu kmene *Erysipelothrix insidiosus* — WR2 pro myši

V dávce vakciny pro 1 myš		Způsob aplikace	Výsledek	
počet živých zárodků	mg hyaluronidázy		vakcinace	vyvolávající infekce
4×10^8	—	<i>i. p.</i>	2/20	—/18
	0,2 0,4 0,6 0,8 1,0	<i>s. c.</i>	2/20	—/18
			1/20	—/19
			2/20	—/18
			—/20	—/20
			1/20	—/19
			3/20	—/17
4×10^7	—	<i>i. p.</i>	3/20	—/17
	0,2 0,4 0,6 0,8 1,0	<i>s. c.</i>	1/20	—/19
			—/20	—/20
			1/20	1/19
			2/20	—/18
			—/20	—/20
			2/20	—/18
4×10^6	—	<i>i. p.</i>	—/20	—/20
	0,2 0,4 0,6 0,8 1,0	<i>s. c.</i>	—/20	—/20
			—/20	—/20
			1/20	—/19
			1/20	—/19
			—/20	—/20
			—/20	—/20
Nevakcinované kontroly		—	10/10	

Výsledek vakcinace: v čitateli uveden počet myši uhynulých po aplikaci vakciny, v jmenovateli počet vakcinovaných myši.

Výsledek vyvolávající infekce: v čitateli počet uhynulých po infekci, v jmenovateli počet infikovaných myši.

II. Výskyt červenkových zárodků v orgánech myši po subkutánní aplikaci s hyaluronidázou resp. intraperitoneální vakcinaci

Den po vakcinaci	Způsob aplikace vakciny	Plice	Srdce	Slezina	Játra	Ledvina	Kost, kostní dřev	Sval	Močový měchýř	Mozek	Místo inokulace
1.	Subkutánně s 0,2 mg hyaluronidázy na 1 myš	4/10	3/10	5/10	1/10	3/10	1/10	4/10	2/10	-/10	10/10
2.		4/10	8/10	9/10	7/10	6/10	5/10	6/10	3/10	-/10	10/10
3.		8/10	8/10	10/10	9/10	10/10	8/10	10/10	7/10	-/10	9/10
4.		9/10	10/10	10/10	9/10	10/10	7/10	10/10	8/10	-/10	4/10
5.		10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	8/10	10/10	10/10	1/10	2/10
6.		10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	9/10	10/10	-/10	2/10
7.		8/10	10/10	10/10	10/10	9/10	10/10	10/10	9/10	-/10	1/10
8.		10/10	10/10	10/10	9/10	10/10	8/10	10/10	10/10	-/10	2/10
9.		10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	7/10	-/10	-/10
10.		6/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	-/10	1/10
15.		-/10	4/10	9/10	8/10	7/10	8/10	6/10	8/10	-/10	-/10
20.		1/10	-/10	10/10	7/10	10/10	10/10	2/10	5/10	-/10	1/10
1.	Intraperitoneálně	1/10	5/10	4/10	3/10	1/10	-/10	2/10	1/10	-/10	—
2.		4/10	7/10	10/10	6/10	5/10	5/10	5/10	4/10	-/10	—
3.		7/10	10/10	10/10	7/10	10/10	6/10	10/10	7/10	-/10	—
4.		9/10	10/10	10/10	10/10	10/10	6/10	10/10	10/10	-/10	—
5.		10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	6/10	-/10	—
6.		10/10	8/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	-/10	—
7.		6/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	9/10	10/10	-/10	—
8.		7/10	10/10	9/10	9/10	9/10	10/10	10/10	8/10	-/10	—
9.		10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10	7/10	1/10	—
10.		8/10	8/10	10/10	10/10	9/10	9/10	10/10	9/10	-/10	—
15.		4/10	5/10	10/10	7/10	8/10	10/10	6/10	9/10	-/10	—
20.		-/10	2/10	10/10	5/10	10/10	9/10	4/10	4/10	-/10	—

V číslkách uveden počet pozitivních izolací zárodků,
v jmenovateli počet vyšetřených orgánů.

III. Vliv způsobu aplikace vakcíny a hyaluronidázy na vývoj imunity u myší

Způsob aplikace vakcíny	Den infekce po vakcinaci	Počet infikovaných myší	Úhyny v den po infekci											% imun-ních myší	Ø doba přežití po infekci
			1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.		
Subkutánně	1.	10	-	1	5	4	-	-	-	-	-	-	-	0	3,3
	2.	10	-	2	4	4	-	-	-	-	-	-	-	0	3,2
	3.	10	-	-	4	4	2	-	-	-	-	-	-	0	3,8
	4.	10	-	-	3	5	1	1	-	-	-	-	-	0	4,0
	5.	10	-	-	1	3	2	2	-	-	-	-	-	20	5,94
	6.	10	-	-	2	-	3	-	1	-	-	-	-	40	7,28
	7.	10	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	80	10,16
	8.	10	-	-	-	-	-	-	-	-	1	-	-	90	10,98
	9.	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	11,2
	10.	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	11,2
	15.	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	11,2
Subkutánně s 0,2 mg hyaluronidázy na 1 myš	1.	10	-	3	6	1	-	-	-	-	-	-	-	0	2,8
	2.	10	-	1	2	2	3	1	1	-	-	-	-	0	4,4
	3.	10	-	-	1	3	3	-	1	-	-	-	-	20	5,9
	4.	10	-	-	1	1	-	-	1	-	-	-	-	70	9,2
	5.	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	11,2
	6.	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	11,2
	7.	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	11,2
	8.	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	11,2
	9.	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	11,2
	10.	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	11,2
	15.	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	11,2
	20.	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	11,2
Intraperitoneálně	1.	10	-	3	4	3	-	-	-	-	-	-	-	0	3,0
	2.	10	-	2	4	3	1	-	-	-	-	-	-	0	3,3
	3.	10	-	-	2	2	4	-	-	-	-	-	-	20	5,6
	4.	10	-	-	2	1	1	-	-	-	-	-	-	60	8,2
	5.	10	-	-	-	1	-	1	-	-	-	-	-	80	9,96
	6.	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	11,2
	7.	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	11,2
	8.	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	11,2
	9.	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	11,2
	10.	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	11,2
	15.	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	11,2
	20.	10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100	11,2
Kontroly		10	-	-	5	4	1	-	-	-	-	-	-	0	3,6

a zárodky zcela vymizely nebo byly izolovány jen výjimečně z plic a srdce. Naproti tomu procento izolací ze sleziny, ledvin a kostní dřeně nejevilo klesající tendenci ani 20. den p. v.

Za účelem zjištění vlivu hyaluronidázy na rychlost nástupu imunity jsme současně s usmrcováním podrobili 10 myší z každé skupiny vyvolávající infekci. Hynutí myší jsme sledovali 11 dní po infekci a z dosažených výsledků vypo-

čítali procento imunních myši a metodou podle Balčeva (1962) průměrnou dobu přežití infekce.

Ve skupině vakcinované samotnou vakcínou *s. c.* uhynuly všechny myši infikované do 4. dne *p. v.*; infekci vykonanou 5. den přežilo 20 % myši. Počet přeživších myši vzrůstal až do 9. dne, kdy už byly proti infekci chráněny všechny myši. Ze skupiny, již byla aplikována vakcína *s. c.* ve směsi s hyaluronidázou, přežilo infekci vykonanou na 3. den 20 %, na 4. den 70 % a na 5. den již 100 % myši. Ve skupině očkované *i. perit.* se úplná chráněnost vyvinula 6. den *p. v.* U obou posledních skupin bylo více než 50 % myši imunních již 4. den, zatímco ve skupině očkované *s. c.* bez hyaluronidázy teprve 7. den *p. v.* (Tab. III.)

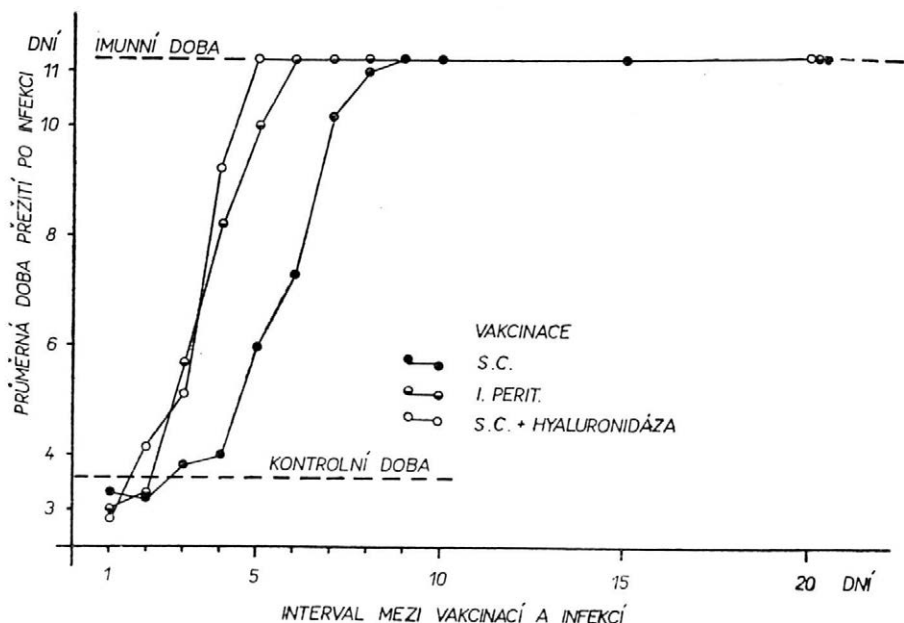
Při infekci uskutečněné 24 hodin po očkování byla u všech tří vakcinovaných skupin průměrná doba přežití průkazně kratší než u kontrolních, nevakcinovaných myši. Nejkratší dobu přežití vykazovala skupina myši, očkovaných současně vakcínou a hyalurodidázou. Ve skupinách myši, které obdržely vakcínu *i. perit.* anebo *s. c.* bez hyaluronidázy, jsme pozorovali zkrácení doby přežití i při infekci vykonané 48 hodin *p. v.* Naproti tomu myši, očkované kulturou s hyaluronidázou, přežívaly infekci, provedenou 48 hodin *p. v.*, již o něco déle než kontroly. Počínaje 3. dnem *p. v.* se průměrná doba přežití u všech tří vakcinovaných skupin postupně prodlužovala, a to nejvíce u skupiny očkované vakcínou s hyaluronidázou (obr. 1, tab. III).

Abychom zjistili, jaký vliv má velikost dávky enzymu na vývoj imunity a zda při *s. c.* aplikaci vakcíny s hyaluronidázou postačí k vyvolání imunity menší počet zárodků než při stejném podání samotné vakcíny, očkovali jsme *s. c.* skupiny po 10 myších kulturou ředěnou od 10^{-1} po 10^{-8} současně s různými dávkami hyaluronidázy a stejnými ředěními kultury bez hyaluronidázy *s. c.* a *i. perit.* Za 14 dní jsme myši všech skupin infikovali virulentním kmenem. Výsledky uvedené v tab. IV ukazují, že rozdíly mezi jednotlivými skupinami nebyly signifikantní. Jak při *s. c.* aplikaci vakcíny s hyaluronidázou tak při *s. c.* nebo *i. perit.* vakcinaci bez hyaluronidázy imunizovala 100 % myši dávka nejméně 6×10^4 živých zárodků. Po očkování počtem zárodků o 1 logaritmickou jednotku nižším se procento imunních myši pohybovalo u jednotlivých skupin mezi 0–40, a to nezávisle na dávce hyaluronidázy.

IV. Vliv způsobu aplikace a hyaluronidázy na imunogenitu vakcíny

Dávka hyaluronidázy pro 1 myš	Způsob aplikace vakcíny	Počet živých zárodků ve vakcinační dávce							
		6×10^8	6×10^7	6×10^6	6×10^5	6×10^4	6×10^3	6×10^2	6×10^1
		výsledek vyvolávající infekce							
—	<i>s. c.</i>	–/9	–/8	–/10	1/10	–/10	10/10	9/10	10/10
—	<i>i. p.</i>	–/8	–/9	–/10	1/10	–/10	6/10	10/10	10/10
0,05 mg	<i>s. c.</i>	–/10	–/10	–/10	2/10	–/10	8/10	9/10	10/10
0,2 mg	<i>s. c.</i>	–/8	–/9	–/10	–/10	–/10	6/10	9/10	10/10
0,4 mg	<i>s. c.</i>	–/8	–/8	–/10	–/10	–/10	10/10	9/10	10/10

V čitateli uveden počet uhynulých, v jmenovateli celkový počet infikovaných myši.



Obr. 1. Vývoj imunity u myši po očkování živou červenkovou vakcinou různým způsobem

Vysvětl.: kontrolní doba: průměrná doba přežití po infekci u kontrolních, nevakcinovaných myši; — imunní doba: teoreticky vypočítaná doba trvání pokusu; při dosažení této průměrné doby přežití jsou všechny myši v skupině imunní

DISKUSE

Dosažené výsledky potvrdily náš předpoklad, že kombinací živé červenkové vakcíny s hyaluronidázou je možno značně urychlit disperzi zárodků do jednotlivých orgánů. Rychlost rozsevu červenkových zárodků do většiny orgánů se po *s. c.* aplikaci vakcíny s hyaluronidázou, v porovnání s výsledky po jejím podání stejným způsobem bez hyaluronidázy (Žák 1965) přibližně zdvojnásobí a je stejná jako po *i. perit.* aplikaci samotné vakcíny. Vysoké procento pozitivních izolací ze sleziny, kostní dřeně a lymfatických uzlin 20. den po vakcinaci nasvědčuje tomu, že zrychlením disperze pomocí hyaluronidázy se nemění ani doba persistence zárodků v organismu ani jejich afinita k některým orgánům.

Podobně jako po *s. c.* podání samotné vakcíny (Žák 1965) nezjistili jsme ani po očkování vakcinou spolu s hyaluronidázou proniknutí zárodků do mozku. Pro rozdílnost našich výsledků od výsledků Tacu a spol. (1961, 1962), referujících o nálezu červenkových zárodků kmene WR 2 v mozcích vakcinovaných myši i holubů, jsme nenašli vysvětlení.

Urychlení disperze zárodků do jednotlivých orgánů je úměrné zkrácení časového intervalu mezi očkováním a nástupem imunity, které představuje u myši až 4 dny. I když nemožno přímo porovnávat výsledky, docílené pomocí hyaluronidázy Möhlmannem a spol. (1956) při terapii červenky sérem a penicilínem s výsledky našich pokusů s živou vakcinou, je pozoruhodné, že hyaluronidáza měla v obou případech stejný účinek: Urychlila léčebný resp. imunizační efekt v stejné nebo i větší míře než očkování intraperitoneální či intravenózní cestou.

Stejně jako v předcházející práci nepotvrdily se ani tentokrát údaje

Gheorghiu a spol. (1958) o vývoji chráněnosti během 4–5 dní po s. c. aplikaci samotné živé vakciny z kmene WR 2. Tohoto efektu jsme dosáhli teprve pomocí hyaluronidázy.

Příčinu urychlení nástupu chráněnosti myši proti vyvolávající infekci účinkem hyaluronidázy nutno vidět ve včasném osídlení orgánů zárodky vakcinačního kmene, při čemž chráněnost může spočívat buď ve včasném navození imunitních mechanismů organismu anebo v inhibici multiplikace zárodků virulentního kmene použitého k čelení, jak předpokládají Tajima a spol. (1957). Podstata účinku hyaluronidázy se urychlením rozptylu zárodků z místa inokulace do jednotlivých orgánů omezuje na zkrácení případně odstranění stadia adaptace zárodků na nové prostředí v místě inokulace. Sotva je možno se domnívat, že by hyaluronidáza mohla ovlivnit imunogenitu červenkové vakciny anebo obranyschopnost organismu v takové míře, jak to vyvozuje Alaverdjan (1962) z pokusů s tetravakcinou. Svědčí pro to jak zjištění, že hyaluronidáza ani ve velkých dávkách neovlivnila počet živých zárodků potřebných na vyvolání imunity (k dosažení imunity při použití hyaluronidázy je potřebný přibližně stejný počet živých zárodků jako bez ní), tak i skutečnost, že v obou případech docházelo účinkem nespecifické obrany k inaktivaci přibližně stejného počtu zárodků.

Toto považujeme současně za příčinu zjištění, že podobně jako Wiidik (1958) v pokusech s kmenem AVR₉, jsme ani my nepozorovali při očkování sestupnými dávkami vakciny z kmene WR 2 pravidelný postupný pokles v počtu imunních myši. V několika případech bylo po očkování jedním ředěním vakciny imunních plných 100 % myši, a po vakcinaci dalším desetinásobným ředěním již žádná myš.

Z našich pokusů, sledujících vliv dávky hyaluronidázy na imunogenitu vakciny, lze jen nepřímo usuzovat na závislost mezi dávkou tohoto fermentu a rychlostí disperze, jak o ní pojednává Hechter (1947). Domníváme se, že urychlení nástupu imunity dosažené pomocí 0,2 mg hyaluronidázy je na hranicích možností reaktivity a obranyschopnosti organismu a že by další zvýšení dávky fermentu, aby se disperze vakcinačních zárodků ještě více urychlila, už sotva mohlo zkrátit dobu potřebnou k vývoji imunity.

Inokulace kmene WR 2 současně s hyaluronidázou nezvyšuje jeho virulenci pro myši. Hynutí po vakcinaci se pohybuje ve stejných mezích jako po očkování bez hyaluronidázy (Gheorghiu a spol. 1958, Žuffa a spol. 1960). Období sensibilizace organismu myši, trvající po očkování samotnou vakcinou 2 až 3 dny, (Žák 1963, 1965), se zkracuje na jediný den.

ZÁVĚR

Po aplikaci živé červenkové vakciny z kmene WR 2 v kombinaci s hyaluronidázou v dávce 0,2 mg na jednu myš se rychlost disperze zárodků do jednotlivých orgánů, v porovnání se stejným způsobem aplikace bez hyaluronidázy, přibližně zdvojnásobí; z většiny orgánů lze zárodky izolovat již za 48 případně 72 hodin po očkování.

Časový interval mezi očkováním a nástupem imunity se zkrátí natolik, že se vyrovná nebo i předčí rychlost vývoje imunity po aplikaci samotné vakciny intraperitoneálně. Vyvolávající infekci, vykonanou 4. den po podání vakciny s hyaluronidázou přežilo 70 %, 5. den již 100 % myši.

Současná aplikace kultury kmene WR 2 a hyaluronidázy nezvyšuje jeho virulenci; zkracuje období sensibilizace po vakcinaci na přibližně jeden den.

Nezjistilo se, že by hyaluronidáza zvyšovala imunogenitu živé červenkové vakciny.

Došlo dne 30. 12. 1965

Literatura

1. ADERHOLD K.: Die Möglichkeiten der Anwendung der Hylase, eines neuen Hyaluronidasepräparates, in der Chirurgie. = „Zbl. Chir.“ 79, 1954, 2003-2008. —
2. ALAVERDJAN M. I.: Gijaluronidaza i gijaluronovaja kislota v nekotorych javljje-

nijach infekciji i immuniteta. VI. Vlijanije gijaluronidazy i gijaluronovoj kisloty na reaktogenost tetravakciny i na preventivnyje svojstva immunnych syvorotok. = „Bjul. eksp. biol. med.“ 53, 1962, 81-85. — 3. BALČEV M. I.: Opredeľane aktivnostta na serumite i vaksinite s pomoštta na faktorite immuno smartno vreme. = „Izv. na Central. vet. Inst. za zar. i parazit. bol.“ 1, 1931, 23-34. — 4. BÁNK E.: Hyasonin-filtratio-ultrahang kombinált kezelés a nögyógyászatban. X „Magy. Nőorv. Lapja“ 21, 1958, 294-297. — 5. BERMAN V. M., SLAVSKAJA E. M., FRODKINA R. V.: Voprosy vozrastnoj immunologii, Leningrad 1947, 158-171. — 6. DURAN-REYNALS F.: Exaltation de l'activité du virus vaccinal par les extraits de certains organes. = „Compt. rend. Soc. Biol.“ 99, 1928, 6-7. — 7. FREISLEDERER W., SCHWEIER P.: Über die Behandlung subduraler Ergüsse im Säuglingsalter mit Hyaluronidase. = „Münch. med. Wschr.“ 99, 1957, 331-335. — 8. GEBAUER H.: Zur Narkose von kleinen Versuchstieren mit Evipan-Natrium. = „Mh. Vet. Med.“ 8, 1953, 248-250. — 9. GHEORGHIU I., ALBU T., STANCA M., EUSTAFIEVICI O.: Cercetari asupra valorii imunogene a vaccinului antirujetic rominesc. = „Lucr. Sti. Inst. Pasteur, Buc.“, 3, 1958, 129-146. — 10. GIBIAN H.: Chemie, biologische Bedeutung und klinische Anwendung der Hyaluronidase. „Angew. Chemie“ 63, 1951, 105-117. — 11. HECHTER O.: Studies on spreading factors. I. The importance of mechanical factors in hyaluronidase action in skin. = „J. exp. Med.“ 85, 1947, 77-97. — 12. CHAIN E., DUTHIE E. S.: A mucolytic Enzyme in Testis Extracts. = „Nature“ 144, 1939, 977-978. — 13. CHAIN E., DUTHIE E. S.: Identity of Hyaluronidase and Spreading factor. X Brit. „J. Exp. Pathol.“ 21, 1940, 324-338. — 14. KUDRJACEVA V. I.: Vlijanije faktora rasprostranjenija na effektivnost vakcinacii BCG. Diss. kand. Leningrad 1950. — 15. LENFELD J., KLABUSSAY L., TRNAVSKÝ K.: Příznivé ovlivnění serotherapie tetanu hyaluronidasou. = „Čs. Fysiologie“ 5, 1956, 64-69. — 16. MÖHLMANN H., HARM M., STÖHR P.: Hyaluronidase in der Rotlauftherapie. „Arch. exp. Vet. Med.“ 10, 1956, 688-698. — 17. REMBEZ I. N.: Preparaty gijaluronidazy i ich primenenije v akušersko-ginekologičeskoj klinike. Zakarp. oblast kniž. gazet. izdat. Užgorod 1962. — 18. TACU D., BURDUCEA O., MINDRAS T.: Dispersarea si persistenta bacilului Erysipelothrix rhusiopathiae in organismul soareci or detectati prin metoda marcarii bacililor cu izotopi radioactivi (P^{32}) comparativ cu metoda bacteriologica. = „Lucr. Sti. Inst. Ser. Vac. Pasteur, Buc.“ 5, 1961, 267-272. — 19. TACU D., ISOPESCU I., BURDUCEA O.: Detectarea bacililor Erysipelothrix rhusiopathiae, marcati cu izotopi radioactivi in organismul purumbelor. = „Lucr. Sti. Inst. Ser. Vac. Pasteur, Buc.“ 6, 1962, 241-245. — 20. TAJIMA Y., KURAMASU Sh., TAJIMA M.: Studies on Erysipelas. I. Infectivity and Immune Response of Albino Mice (ddN-Stock) to Erysipelothrix rhusiopathiae. = „Zbl. Vet. Med.“ 4, 1957, 1-17. — 21. TRIUS M. V., JAŠČENKO T. N.: Opyt ispolzovanija faktora (faktora rasprostranjenija) dlja usilenija immunogenogo dejstvija vakciny BČŽ v eksperimente. = „Probl. Tub.“ č. 4, 1953, 13-19. — 22. WIIDIK R. W.: Weitere Untersuchungen über den schwedischen avirulenten Rotlaufimpfstoff AV/R 9. = „Zbl. Vet. Med.“ 5, 1958, 1-16. — 23. ŽÁK K.: Hyaluronidasa v kombinaci s Diodonem při hysterosalpingografii. = „Acta gyn. Brun. Clin. II.“ 4, 1957, 111-114. — 24. ŽÁK O.: Tvorba imunity u myši po aplikaci živé červenkové vakciny. Ref. přednesený na 7. věd. konf. VĚ Brno, 27-29. 9. 1962. — 25. ŽÁK O.: Perzistence červenkových zárodků kmene WR 2 v orgánech myši a vývoj imunity. = „Vet. Medicina“ 10, 1965, 163-172. — 26. ZUFFA A., NOVÁK Z., RAJTAR V.: Porovnanie imunizačneji účinnosti živých avirulentných vakcín proti červienke ošípaných s účinnosťou inaktivovanej červienkovej adsorbátovej vakcíny. = „Vet. čas.“ 9, 1960, 447-461.

Влияние гиалуронидазы на дисперсию вакцинных зародышей и на создание иммунитета после прививки живой вакцины рожи штамма WR2

После прививки живой вакцины рожи штамма WR2 в комбинации с гиалуронидазой в дозе 0,2 мг на одну мышь скорость дисперсии зародышей в отдельные органы, по сравнению с таким же способом прививки без иалуронидазы, примерно удвоится; у большинства органов можно зародышей изолировать уже спустя 48, а иногда и 72 часа после прививки.

Отрезок времени между прививкой и наступлением иммунитета сокращается настолько, что он выравнивает или даже превосходит скорость развития иммунитета после интраперитонеального введения одной только вакцины. Вызванную инфекцию, проведенную на 4-й день после вакцинирования иалуронидазой, перенесло 70 %, а на 5-й день — уже 100 % мышей.

Одновременное введение культуры штамма WR2 с гиалуронидазой не увеличивает его вирулентности; это сокращает период сенсibilизации после вакцинирования приблизительно до одного дня.

Увеличения иммуногенитета живой вакцины рожи в результате введения гиалуронидазы установлено не было.

Influence of Hyaluronidase on the Dispersion of the Vaccination-Germs and on the Onset of Immunity after the Vaccination with Live Swine-Erysipelas Vaccine of the WR 2-Strain

After the application of live swine-erysipelas vaccine of the WR 2 strain combined with hyaluronidase in the dose of 0,2 mg per one mouse, the dispatch of dispersion of germs into different organs is redoubled in comparison with the same way of application without hyaluronidase; from the majority of organs the germs may be isolated as early as after 48, eventually 72 hours after the vaccination.

The time interval between the vaccination and the onset of immunity is as much shortened as to be equal or even to surpass the dispatch of the immunity development after the application of the pure vaccine intraperitoneally. The provoking infection carried out on the 4th day after the application of the vaccine with hyaluronidase was survived by 70 %, on the 5th day by as many as 100 % of mice.

Simultaneous application of the WR 2-strain culture and hyaluronidase does not increase its virulence; it reduces the period of sensibilization after the vaccination to approximately one day.

It was not ascertained that hyaluronidase should increase the immunogenicity of the live swine-erysipelas vaccine.

Einfluß der Hyaluronidase auf die Dispersion der Vakzinationskeime und auf den Eintritt der Immunität nach der Impfung mit lebendiger Rotlaufvaccine aus dem Stamm WR 2

Nach der Applikation der lebendigen Rotlaufvaccine aus dem Stamm WR 2 in Kombination mit Hyaluronidase in einer Dosis von 0,2 mg je eine Maus wird die Schnelligkeit der Dispersion von Keimen in die einzelnen Organe, im Vergleich zu derselben Applikationsart ohne Hyaluronidase, annähernd verdoppelt; von der Mehrheit der Organe kann man die Keime bereits nach 48 bzw. 72 Stunden nach der Impfung isolieren.

Der Zeitintervall zwischen der Impfung und dem Eintritt der Immunität wird derart gekürzt, daß er der Schnelligkeit der Entwicklung der Immunität nach intraperitonealer Applikation alleiniger Vaccine gleichgestellt ist, oder dieselbe sogar übertrifft. Die hervorgerufene Infektion, die am 4. Tage nach dem Verabreichen der Vaccine mit Hyaluronidase durchgeführt wurde, überlebten 70 %, die am 5. Tage bereits 100 % der Mäuse.

Eine gleichzeitige Applikation der Kultur des Stammes WR 2 und Hyaluronidase erhöht nicht seine Virulenz; sie verkürzt den Zeitraum der Sensibilisierung nach der Vakzination auf cca einen Tag.

Man stellte nicht fest, daß die Hyaluronidase die Immunogenität der lebendigen Rotlaufvaccine etwa erhöhen würde.

Adresa autora:

Dr. Otokar Žák, Bioveta, n. p., Nitra

■ Fyzikální a chemické vlastnosti, jako velikost, tvar, citlivost vůči pH, teplotu a různým chemickým prostředkům jsou vedle charakteristických kultivačních a sérologických znaků významným vodítkem pro typizaci a třídění virů. Inaktivace virové suspenze zahřátím na 50° C po 30 minut je podle H u c k a (1964) vhodným testem pro třídění virů do skupin. Viry skupiny neštovic jsou poměrně termostabilní, zatímco skupina herpesvirů a myxovirů, mezi něž patří i *Myxovirus multiforme*, původce pseudomoru drůbeže, je termolabilní. Termostabilitou se liší i reoviry od labilních picornavirů.

U viru pseudomoru drůbeže lze teplem postihnout jeho hemaglutinující, infekční i hemolytickou složku. Úkolem této práce bylo zjistit, zda je možno tepelnou inaktivací prvních dvou složek odlišit nebo charakterizovat jednotlivé kmeny viru pseudomoru drůbeže (NDV) s rozličnou virulencí.

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Schopnost jednotlivých kmenů viru pseudomoru drůbeže (NDV) aglutinovat erythrocyty je v rozsahu teplot 50–60° C různě trvalá, podobně jako u jiných hemaglutinujících virů (Hallauer 1950). Stupeň termorezistence je podle H a n s o n a (1949) charakteristickou vlastností, vhodnou pro rozlišení jednotlivých kmenů. Může se měřit časovým obdobím nutným k inaktivaci hemaglutininu při určité konstantní teplotě, a to při 56° C podle H a n s o n a a 52° C podle A c o c e l l y (1955), nebo vystavením virové suspenze působení různých teplot po určitou dobu.

Stabilita hemaglutininů 31 kmenů vůči teplotě 56° C kolísala mezi 5 minutami až 6 hodinami (H a n s o n 1949). B u s h n e l l a E r w i n (1950) zjistili u 5 kmenů, izolovaných z místních vzplanutí, že hemaglutinační (HA) schopnost se snižuje při 56° C a rychle klesá při 58° C. K i r k h a m (1962) pozoroval rychlý pokles HA aktivity u termolabilních linií mezi 47–52° C, zatímco stabilní si uchovaly HA aktivitu i při 56° C. P o d l e L a n c a s t e r a (1962) se hemaglutininy lentogenních kmenů B-1 a F inaktivují při 56° C do 15 min.

Termostabilita virů není však jejich trvalým a neproměnlivým znakem. Je ovlivňována složením prostředí, v kterém je virus suspendován, jakož i způsobem a dobou skladování virového materiálu. Sklon k poklesu termostability nastává často i po dlouhodobém pasážování viru v kuřecích embryích (KE).

N i t z s c h k e a S c h m i t t d i e l (1963) zkoumali termostabilitu hemaglutininů u 22 terénních a 4 vakcinačních kmenů NDV při 56° C. U lentogenních, mezogenních a 12 terénních kmenů zjistili pokles HA aktivity během 15 min. na méně než 1 : 10. Jen v jednom případě došlo k zachování HA aktivity i po 120 min. U 14 kmenů byly opakovaným vyšetřením zjištěny shodné výsledky, u 8 kmenů pozorováno ko-

lísání v rozsahu jednoho časového intervalu a u 4 kmenů byly v rozmezí 15–120 min. zaznamenány rozdíly mezi jednotlivými vyšetřeními. Watanabe (1964) rozděljuje kmeny NDV podle termostability hemaglutininů (56°C 30 min.) na stabilní — terénní, virulentní a labilní — vakcinační, avirulentní nebo slabě virulentní.

Infekční schopnost NDV byla inaktivována podle Farinase (1930) při 55°C a vyšších teplotách po 30 minutách, zůstala však zachována při 50°C. Iyer (1943) udává, že NDV byl usmrcen zahřátím na 50°C a výše. Podle Brandlyho (1946) ztratily kmeny H a 11914 infekciozitu po 30 min. při 60°C nebo během 45 min. při 55°C. Bushnell a Erwin (1950) stanovili bod termální inaktivace mezi 58 a 64°C po 30 min. Asplin (1949) zjistil infekční tekutiny aktivní ještě po 45 min. při 56°C, ale nikoliv po 60 min. Při zkoumání termostability 4 kmenů NDV různé virulence zjistili Foster a Thompson (1957), že jejich schopnost přežít mimo živočišný organismus je závislá spíše na původním množství viru než na jeho virulenci.

Tolba et al. (1962) porovnávali účinek teploty 50, 60 a 70°C na HA aktivitu a infekčnost u 3 kmenů viru pseudomoru a 5 kmenů, resp. linií viru klasického moru. Zjistili, že teplota 50°C po dobu 5 min. neovlivňuje HA aktivitu ani infekčnost kmenů NDV. Po 30 min. došlo k mírnému poklesu HA aktivity a výraznému poklesu infekčnosti, v 60. minutě nezjištěn další pokles HA aktivity, ale infekčnost poklesla na nulové hodnoty. Ve 120. min. byl zaznamenán opět pokles HA aktivity. U kmenů klasického moru začal pokles HA aktivity až v 60. nebo 120. min. Hemaglutinační schopnost NDV se inaktivuje během 5 min. při teplotách mezi 53 a 56°C, infekčnost za stejnou dobu při teplotách 56, 59 resp. 60°C. Pro virus klasického moru jsou nutny vyšší teploty (58–60°C) k inaktivaci HA aktivity.

V pokusech Hansona (1949) přežilo všech 31 vyšetřených kmenů NDV 15 min. při 56°C, tři byly inaktivovány mezi 15–30 min., 25 mezi 30 a 180 min. a tři další si uchovávaly infekciozitu i po 180 min. Z jednoho kmene byly získány mutanty, které odolávaly teplotě 56°C i po 240 min., naproti tomu rodičovská generace přežila jen 60 min.

MATERIÁL A METODIKA

Ve svých pokusech jsme použili 3 kmeny lentogenní: B-1 (Hitchner), La Sota a F (Asplin), 4 mezogenní: Roakin (R), Lederle (L), Hertfordshire (H) a Komarov (Haifa, K) a 2 kmeny virulentní, 2455/6 a 366/4. Všechny kmeny jsme získali ze sbírky virových kmenů Biovety n. p. v Nitře. Z velogenních kmenů, používaných v Biovetě n. p. Nitra k čelení pokusné drůbeže, byl kmen 2455/6 izolován r. 1955 z mozku uhynulé slepice na ŠVVÚ Bratislava (Žuffa et al. 1956, Škoda, Žuffa 1956, 1958), kmen 366/4 v r. 1963 z vrány popelavé na Katedře infekčních chorob Veterinární fakulty VŠP v Košicích (Vrtiak et al. 1964). U kmene Roakin byla vyšetřena jeho 21. sériová pasáž na kulturách kuřecích embryonálních buněk (KEB). Pokusně byl vyšetřen i neidentifikovaný kmen, který kontaminoval virus ptačí difterie během jeho sériového pasážování na kulturách KEB.

Všechny kmeny byly uchovávány v lyofilizovaném stavu. Virus pro pokusné účely jsme získali infekcí 10denních KE ředěním 10^{-3} při lentogenních a mezogenních — ředěním 10^{-5} při velogenních kmenech dávkou 0,2 ml do alantoidní dutiny. KE, infikovaná velogenními a mezogenními kmeny, byla inkubována při 37°C 48 hod., lentogenními kmeny 72 hod. Směs infekčních alanto-amniotických tekutin (AAT) z 10–12 KE jsme ředili fyziologickým roztokem s veronalovým nárazníkem o pH 7,0–7,1 v poměru 1 : 10 a rozplnili po 3 ml do 9 zkumavek, zazátkovaných korkovými zátkami.

Osm zkumavek bylo hned po odběru a nařazení ponořeno do vodní lázně s míchacím zařízením při stálé teplotě 56°C $\pm$ 0,2 na dobu 1, 2, 4, 8, 15, 30, 60 a 120 minut. Jedna zkumavka byla ponechána jako kontrola při laboratorní teplotě. Po uplynutí stanovené doby zahřívání byly zkumavky s neředěnou

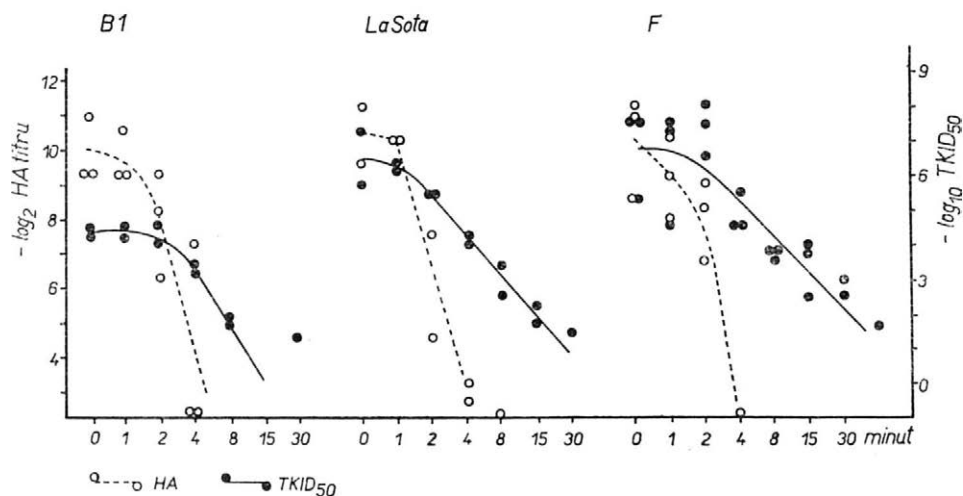
AAT postupně z lázně vyjímány, zchlazeny proudem tekoucí vody a uloženy v chladničce při $+4^{\circ}\text{C}$. Po ukončení inaktivace byla stanovena hemaglutinační aktivita a infekčnost jednotlivých vzorků. Při stanovení HA bylo k 0,5 ml AAT, ředěné v poměru 1 : 10 – 1 : 5120, přidáno po 0,5 ml 0,5% suspenze kohoutích erytrocytů. Reakce byla posuzována za 1 hod. při laboratorní teplotě. Jako HA titer bylo odečteno nejvyšší ředění, v němž došlo alespoň k 50% aglutinaci erytrocytů.

Infekčnost jednotlivých vzorků viru jsme stanovili infekcí zkumavkových kultur KEB. Virus jsme ředili v desetinasobných potencích a každým ředěním očkovali po 4 zkumavkových kulturách KEB dávkou 0,1 ml. Pomnožení viru bylo posuzováno po 6–7 dnech inkubace při 37°C u mezogenních a velogenních kmenů zjišťováním přítomnosti cytopatogenního efektu (CPE) a hemaglutininu, u lentogenních kmenů jen HA testem: Do každé zkumavky bylo přidáno po 1 ml 0,5% suspenze kohoutích erytrocytů a HA byla odečítána po 1 hod. stání při laboratorní teplotě. U mezogenních a velogenních kmenů byly výsledky mikroskopického vyšetření shodné s výsledky HA testu, u lentogenních kmenů není pomnožení viru ve zkumavkách, očkovaných vyššími ředěními, doprovázeno vývojem CPE. Titr viru byl stanoven akumulacním výpočtem podle Reeda a Muenche (1938).

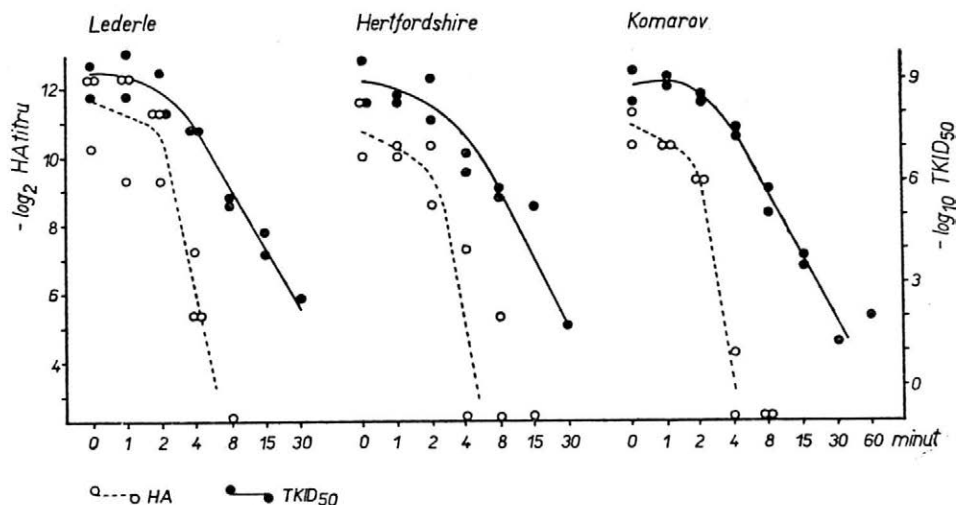
U každého kmene jsme vyšetření opakovali 2–4krát. Zjištěné hodnoty jsme vynášeli do grafu a interpolací středních hodnot sestrojili křivky poklesu HA aktivity a infekčnosti. Aby byla zdůrazněna počáteční fáze inaktivace viru v prvních 10 min., byla použita pro obě křivky společná stupnice času s časovými intervaly v geometrické řadě.

VÝSLEDKY POKUSŮ

Křivky, znázorňující pokles HA aktivity, mají zhruba shodný průběh u lentogenních a mezogenních kmenů (obr. 1.–3.). Ve všech případech docházelo k úplné inaktivaci hemaglutininů při 56°C do 15 min., ve většině případů, s jedinou výjimkou kmene Hertfordshire (obr. 2.), již do 4 nebo 8 min. V první



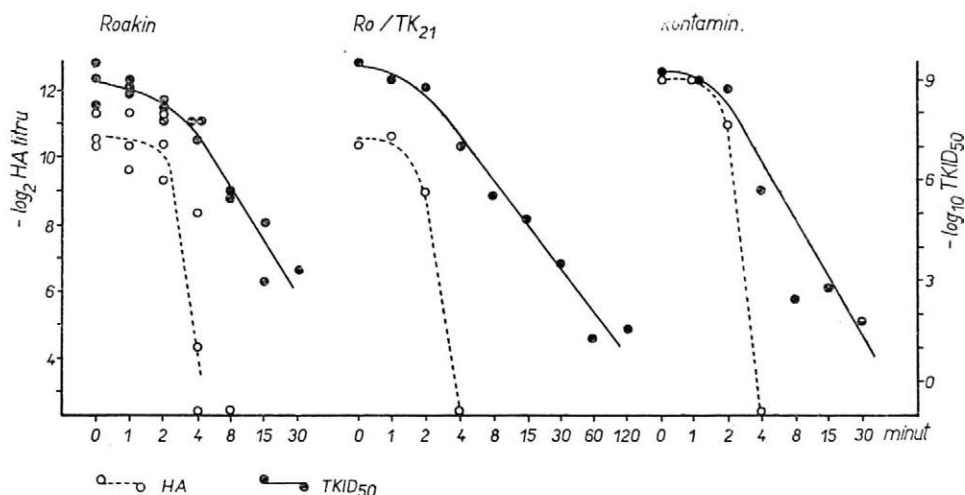
1. Křivky inaktivace HA aktivity a infekčnosti lentogenních kmenů NDV při teplotě 56°C



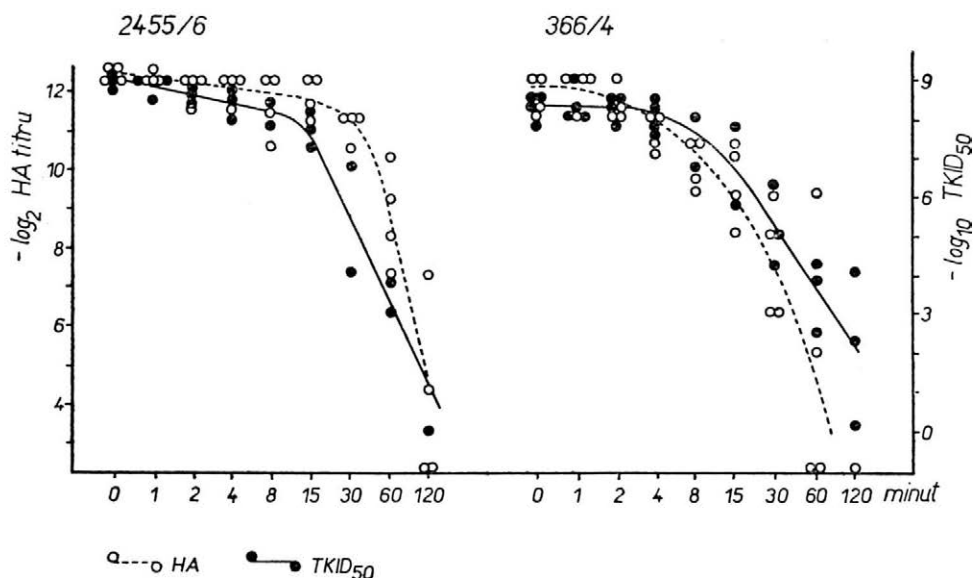
2. Křivky inaktivace HA aktivity a infekčnosti mezogenních kmenů při teplotě 56°C

minutě byl pokles jen mírný, někdy bylo zaznamenáno dokonce proti výchozí hodnotě mírné zvýšení. Po 2. min. je pokles výraznější a představuje 1–4 dvojnásobná ředění, načež dochází k prudkému zlomu, takže ve většině případů dosahuje už ve 4. minutě nulových hodnot nižších než 10^{-1} .

Na rozdíl od slabě virulentních kmenů vykazoval velogenní kmen 2455/6 (obr. 4.) do 30. min. jen velmi mírný pokles HA aktivity, nepřesahující jedno dvojnásobné ředění. Ke zlomu křivky dochází až mezi 30. a 60. min., kdy hodnoty HA titru se snižují v průměru o další 4 ředění. Po 120 min. dosahuje HA titr hodnoty o 7,5 ředění nižší, než byl výchozí titr, ve dvou případech klesá pod minimální pracovní ředění 10^{-1} , v jednom si uchovává titr $10^{-1,3}$ a v jednom



3. Křivky inaktivace HA aktivity a infekčnosti mezogenního kmene Roakin, jeho 21. pasáže na kulturách KEB a neidentifikovaného, kontaminujícího kmene při teplotě 56°C



4. Křivky inaktivace HA aktivity a infekčnosti velogenních kmenů NDV při teplotě 56°C

dokonce $10^{-2,2}$ — tj. ředění 1:160. Naproti tomu virulentnější kmen 366/4 (obr. 4.) zaznamenává sice pozvolný, ale pravidelný pokles HA aktivity už po 2 min. zahřívání a po 120 min. dosahuje ve všech případech nulových hodnot.

Podobně jako průběh křivek HA aktivity, nevykazuje ani průběh křivek infekčnosti, odhlédneme-li od různých výchozích hodnot, podstatných rozdílů mezi lentogenními a mezogenními kmeny. Výrazný zlom v průběhu křivek se zaznamenává po 4 min. a odtud klesají hodnoty infekčnosti pravidelně a dost prudce, i když v tupějším úhlu než hodnoty hemaglutininu. Obdobně jako u HA aktivity, bylo po 1 min. zahřívání zaznamenáno mírné zvýšení i v případě infekčnosti.

Křivka infekčnosti kmene 2455/6 klesá mírně až do 15 min. Ačkoliv tato první část křivky je strmější než křivka HA aktivity, ve své druhé části, po zlomu, má průběh podobný jako u mezogenních kmenů. Rozdíly mezi průběhem inaktivace infekčnosti kmene 2455/6 a 366/4 jsou výrazné. U kmene 366/4 po prakticky přímém průběhu do 4 min. dochází k pozvolnému zalomení křivky v táhlém oblouku v rozmezí od 4. do 15. min. se snížením infekčnosti o dvě logaritmické jednotky. Poslední sestupná část křivky je poměrně pozvolná, přičemž po 120 min. dosahuje průměrné hodnoty $TKID_{50} 10^{-2,1}$.

Pokles hemaglutinační aktivity a infekčnosti kmene Roakin v 21. sériové pasáži na kulturách KEB má zhruba stejný průběh jako výchozí virus. (Obr. 3.) Křivky inaktivace obou sledovaných komponent kontaminujícího kmene NDV z TK jsou typické pro mezogenní kmeny. Bližší identifikace kmene není možná podle průběhu inaktivace hemaglutininů a infekčnosti, je však možno s určitostí vyloučit, že jde o velogenní kmen. Protože se v době kontaminace pracovalo jen s kmeny 366/4 a Roakin, jde pravděpodobně o kmen Roakin nebo o jeho linii, pasážovanou na tkáňové kultuře.

Z dosažených výsledků vyplývá, že hemaglutinin lentogenních a mezogenních kmenů NDV je při teplotě 56°C velmi labilní a inaktivuje se prakticky už

do 8 min. Naproti tomu u velogenních kmenů dochází k úplné inaktivaci hemaglutininů až za 120 min., případež později. Protože u lentogenních a mezogenních kmenů není významného rozdílu v termorezistenci hemaglutininů mezi jednotlivými kmeny, může sloužit stanovení průběhu inaktivace HA aktivity jen jako skupinový ukazatel. U velogenních kmenů je průběh inaktivace výrazně odlišný nejen v porovnání s oběma skupinami méně virulentních virů, ale i mezi sebou.

Ukazatelem, který je pro diferenciaci obou skupin kmenů s rozdílnou virulencí typičtější, než termorezistence hemaglutininu, je vztah mezi poklesem HA aktivity a poklesem infekčnosti. Mezogenní kmeny se liší od lentogenních hlavně poměrem výchozích hodnot, a to relativně nižšími výchozími hodnotami infekčnosti. Ve skupině lentogenních kmenů se zřetelně odlišují jednotlivé kmeny vzájemným poměrem obou inaktivačních křivek, i když tyto rozdíly nelze považovat za signifikantní. Obě skupiny slabě virulentních kmenů se celým průběhem inaktivace obou komponent výrazně liší od velogenních kmenů, které si kromě toho zachovávají svou individualitu v rámci skupiny. Kmen Roakin si po 21. pasáži na kulturách KEB zachoval nezměněnou termostabilitu hemaglutininů a infekčnost vůči teplotě 56° C.

DISKUSE

V pokusech analogických s našimi nezaznamenal Vrtiak (1963) po 90 min. působení teploty 55° C infekčnost u žádného z 5 vyšetřovaných kmenů, zatímco u 2 kmenů (USA, Věna) se po 120 min. snížil HA titr jen o 1–2 ředění. Na rozdíl od těchto pozorování, podle nichž se hemaglutinační schopnost viru zachovala při teplotě 50 a 55° C déle než schopnost vyvolat infekci KE, což pozorovala Goldmanová a Hanson (1955) jen u termostabilní mutanty kmene NAI, klesala v našich pokusech s výjimkou kmene 2455/6 prakticky ve všech případech křivka HA aktivity mnohem rychleji a strměji než křivka infekčnosti pro TK. Tuto skutečnost dokládá Koch (1962) pozorováním termální inaktivace poliovirů, při níž zvýšení teploty působí především změny proteinového obalu, který je u NDV nositelem HA aktivity (Rott et al. 1963), a RNK, která je nositelem infekčnosti, je poměrně termostabilní, a proto je postižena později.

Naši dosažené výsledky nepotvrzují jednoznačně pozorování Hansona (1959), že u vakcinačních kmenů dochází při nízkých HA titrech k inaktivaci teplem obvykle rychleji než při vyšších hodnotách. Na druhé straně však poměrně značné kolísání HA titrů, zaznamenané u jednotlivých vyšetřovaných též výchozího viru v počátečních fázích inaktivace v rozsahu až 3 ředění a v konečné fázi až do 8 ředění při pokusech, prováděných za konstantních podmínek, potvrzuje Hansonovo zjištění, že termostabilita hemaglutininů je ovlivňována nekontrolovatelnými faktory prostředí. Rozptyl hodnot TKID₅₀ je při jednotlivých vyšetřováních mnohem menší a je vysvětlitelný kolísáním v mezích biologické odchylky. Relativní stálost výsledků, získaných tepelnou inaktivací, dokázal Hanson (podle Pickena 1964), který v r. 1958 vyšetřil 83 sbírkových kmenů po působení teploty 56° C a až na 6 výjimkách dosáhl výsledky souhlasné s hodnotami, nalezenými v r. 1955.

Skutečnost, že viry reagují různě, jsou-li podrobeny působení tepla, vede k hypotéze, že tyto rozdíly jsou nějakým způsobem vázány na rozdíly ve složení a struktuře virové částice. Předpokládají se dvě možnosti účinku tepla na virovou částici a to, buď že následkem různé expanze subjednotek virové částice dojde k irreverzibilním změnám jejich prostorové integrity, které mají za následek změnu nebo ztrátu funkce virové částice (Pollard 1960), anebo že se působením tepla alterují nejdříve nejcitlivější a později méně citlivé složky virové částice, což se projevuje různými změnami její aktivity (Picken 1964).

SOUHRN

Vyšetřením rezistence hemaglutininu a infekčnosti vůči teplotě 56° C 3 lentogenních, 4 mezogenních a 2 velogenních kmenů NDV bylo zjištěno, že stanovení termostability NDV je možno použít k diferenciaci virulentních kmenů

od kmenů se sníženou virulencí. Tato metoda však neumožňuje spolehlivé rozlišení kmenů lentogenních od mezogenních. HA aktivita lentogenních a mezogenních kmenů je inaktivována do 4 resp. 8 min., velogenních kmenů mezi 60 a 120 min. i později. Infekčnost je za stejných podmínek inaktivována mnohem pomaleji, mezi 15 a 120 min. i později, přičemž i méně virulentní kmeny mohou překonat i hranici 120 minut.

Došlo dne 30. 12. 1965

Literatura

1. ACOCELLA M.: Sulla termostabilità del potere emoagglutinante del virus della pseudopeste aviaria = „Vet. ital.“, 6, 699, 1955 (cit. podle NITZSCHKE et al. 1963).
2. ASPLIN F. D.: Observations on the viability of Newcastle disease virus = „Vet. Rec.“, 61, 159, 1949.
3. BRANDLY C. A., MOSES H. E., JUNGHER E. L., JONES E. E.: Isolation and identification of NDV = „Am. J. vet. Res.“, 7, 289, 1946.
4. BRANDLY C. A.: Newcastle disease, In: BIESTER H. E., SCHWARTE L. H.: Diseases of poultry, 464, 1959.
5. BUSHNELL L. D., ERWIN L. E.: Studies on Newcastle disease. VI. Thermostability of NDV and its antibody = „Trans. Kansas Acad. Sci.“, 53, 68, 1950 (cit. podle PICKEN 1964).
6. FARINAS E. C.: Avian pest, a disease of birds hitherto unknown in the Philippine Islands = „Philippine J. Agr.“, 1, 311, 1930 (cit. podle PICKEN 1964).
7. FOSTER N. M., THOMPSON C. H. jr.: The comparative thermostability of four strains of NDV of widely varying virulence = „Vet. Med.“, 52, 119, 1957.
8. GOLDMAN E. C., HANSON R. P.: The isolation and characterisation of heat-resistant mutants of the Najarian strain of NDV = „J. Immunol.“, 74, 101, 1955.
9. HALLAUER C.: Die Haemagglutination durch Virusarten, In: DOERR R., HALLAUER C.: Handbuch der Virusforschung, II., Wien 1950, (cit. podle NITZSCHKE 1963).
10. HANSON R. P.: Characteristics of certain strains of NDV, Ph. D. Thesis, Univ. Wisconsin, 1949 (cit. podle PICKEN 1964).
11. HANSON R. P., UPTON E., BRANDLY C. A., WINSLOW N. S.: Heat stability of haemagglutinin of various strains of NDV = „Proc. Soc. exp. Biol. Med.“, 70, 283, 1949.
12. HANSON R. P.: Osobní sdělení, 1959 (cit. podle NITZSCHKE 1963).
13. HOFSTAD M. S., YODER H. W.: Inactivation rates of some lyophilized poultry viruses at 37° and 30° C = „Avian Dis.“, 7, 170, 1963.
14. HOFSTAD M. S., PICKEN J. C., COLLINS K. E., YODER H. W.: Immunogenicity of inactivated NDV preparations = „Avian Dis.“, 7, 435, 1963.
15. HUCK R. A.: The classification of viruses = „Vet. Bull.“, 34, 239, 1964.
16. IYER S. G.: Studies on Newcastle (Ranikhet) disease virus. I. Review of previous work = „Indian J. vet. Sci.“, 13, 1, 1943 (cit. podle BRANDLY 1959).
17. KASCHULA V. R.: Studies on the heat stability of the haemagglutinin of various strains of NDV = „J. S. African vet. med. Assoc.“, 23, 110, 1952 (cit. podle PICKEN 1964).
18. KIRKHAM W. W.: Effects of heat and gamma radiation on selected substrains of NDV = „Diss. Abstr.“, 23, 134, 1962 (cit. podle PICKEN 1964).
19. KOCH G.: Über die Hitzeinaktivierung von Polioviren und isolierter Poliovirusnucleinsäure = „Zbl. Bakt., Paras., Inf. Hyg.“, 184, 165, 1962.
20. LANCASTER J. E.: Newcastle disease strain F. A review = „Canad. J. comp. Med. vet. Sci.“, 26, 285, 1962.
21. NITZSCHKE E., SCHMITT-DIEL E.: Zur Thermoresistenz des Hämagglutinins als kennzeichnendes Merkmal von Virusstämmen der Newcastle-Krankheit. = „Zbl. Vet. Med.“, B 10, 121, 1963.
22. PICKEN J. C.: Thermostability of Newcastle disease virus, In: HANSON R. P. a kol.: NDV - an evolving pathogen, Univ. of Wisconsin, 167, 1964.
23. POLLARD E. C.: Theory of the physical means of the inactivation of viruses. = „Ann. N. Y. Acad. Sci.“, 83, 654, 1960.
24. REED L., MUENCH H.: A simple method of estimating fifty percent endpoints. = „Amer. J. Hyg.“, 27, 493, 1938.
25. ROTT R., FRANK H., SCHÄFER W.: Isolierung und Eigenschaften der Hämagglutinierenden Komponente des Virus der Newcastle Disease. = „Z. Naturforsch.“, 16b, 625, 1961.
26. ROTT R., REDA I. M., SCHÄFER W.: Charakterisierung der verschiedenen, nach Infektion mit Newcastle Disease Virus auftretenden, nichtinfektiösen-hämagglutinierenden Teilchen. = „Z. Naturforsch.“, 18b, 188, 1963.
27. SALK J. E.: Variation in influenza viruses. A study of heat stability of the red cell agglutinating factor. = „Proc. Soc. exp. Biol. Med.“, 63, 134, 1946.
28. ŠKODA R., ZUFFA A.: Newcastelská choroba u bažantů. = „Vet. časopis“, 5, 441, 1956.
29. ŠKODA R., ZUFFA A.: Epizootológia Newcastelskej choroby na Slovensku, doterajšie výsledky prevencie a perspektívy pre likvidáciu. = „Vet. časopis“, 7, 46, 1958.
30. TOLBA M. K.,

ESKAROUS J. K.: Effect of temperature on the hemagglutination activities and infectivity to chick embryos of different strains of Newcastle disease and fowl-plague viruses = „Arch. Mikrobiol.“, 43, 234, 1962. — 31. VRTIAK O. J.: Niektoré vlastnosti vírusov pseudomoru hydiny na Slovensku = „Folia vet. Cass.“, 7, 49, 1963. — 32. VRTIAK O. J., MICHALOV J., PAUER T., KAPITANČÍK B.: Izolácia vírusu pseudomoru hydiny z vrany popolavej (*Corvus corone cornix*) = „Folia vet. Cass.“, 8, 207, 1964. — WATANABE M., In: HANSON R. P. a kol.: NDV - an evolving pathogen, Univ. of Wisconsin, 225, 1964. — 34. WOESE C. R.: Thermal inactivation of animal viruses = „Ann. N. Y. Acad. Sci.“, 83, 741, 1960. — 35. WOODROOFE G., M.: The heat inactivation of vaccinia virus = „Virology“ 10, 379, 1930. — 36. ŽUFFA A., ŠKODA R., MICHÁLEK K., KROŠLÁK V., BAUMGÄRTNER L.: Výroba ochranného séra proti Newcastleovej chorobe hydiny a jeho vyhodnotenie na kurčatách = „Vet. časopis“ 5, 22, 1956.

Влияние температуры на гемагглютинационную активность и инфекционность некоторых штаммов вируса ньюкальской болезни (NVD) — I. Возможность характеристики штаммов разной вирулентности при помощи инактивации теплом

Путем исследования устойчивости гемагглютинина и инфекционности к температуре 56° C трех лентогенных, четырех мезогенных и двух велоогенных штаммов NDV было обнаружено, что установление термоустойчивости NDV можно использовать для дифференциации вирулентных штаммов от штаммов с пониженной вирулентностью. Однако такой метод не гарантирует надежного различения лентогенных штаммов от мезогенных. Гемагглютинирующая (ГА) активность лентогенных и мезогенных штаммов инактивируется в течение 4 или 8 минут, а велоогенных — в пределах 60–120 минут и больше. Инфекционность при одинаковых условиях инактивируется гораздо медленнее — между 15 и 120 минутами и дольше, причем даже штаммы с меньшей вирулентностью могут преодолеть предел 120 минут.

The Influence of Temperature on the Hemagglutination Activity and on the Infectivity of some NDV Strains — I. The Possibility of a Characterization of Strains of Differing Virulence by means of Thermal Inactivation

Investigation of the resistance of hemagglutinin and of infectivity to a temperature of 56° C of 3 lentogenic, 4 mesogenic, and of 2 velogenic NDV strains showed that the estimating the thermostability may be used for the differentiation of virulent strains from strains with lowered virulence. However, this method does not make it possible to reliably distinguish lentogenic strains from mesogenic ones. The HA activity of lentogenic and mesogenic strains is inactivated within 4 or 8 minutes, and of velogenic strains in between 60 and 120 minutes or even later. Under equal conditions infectivity is inactivated much slower, between 15 and 120 minutes and later, whereby also less virulent strains may extend the limit of 120 minutes.

Der Einfluß der Temperatur auf die Hämagglutinationsaktivität und Infektiosität einiger Newcastle-Krankheit-Virusstämme (NDV) — I. Die Möglichkeit der Charakteristik der Stämme von verschiedener Virulenz mittels der Hitzeinaktivierung

Durch die Untersuchung der Widerstandsfähigkeit von Hämagglutinin und der Infektiosität gegen Erhitzung auf 56° C von 3 lentogenen, 4 mesogenen und 2 velogenen NDV-Stämmen stellte man fest, daß die Bestimmung der Thermostabilität von NDV zur Differenzierung virulenter Stämme von Stämmen mit herabgesetzter Virulenz angewendet werden kann. Diese Methode ermöglicht jedoch keine verlässliche Unterscheidung lentogener Stämme von mesogenen. Die Hämagglutinations-Aktivität der lentogenen und mesogenen Stämme wird bis 4 bzw. 8 Minuten, der velogenen Stämme von 60 bis 120 Minuten und später inaktiviert. Die Infektiosität wird bei gleichen Bedingungen viel langsamer inaktiviert, und zwar zwischen 15 und 120 Minuten und später, wobei auch weniger virulente Stämme die Grenze von 120 Minuten überschreiten können.

Adresa autora:

MVDr. Karel Černík, Bioveta n. p., Nitra

■ Komplementfixační reakce má být podle Slonima a Slonimové (1956) specifická, citlivá, stabilní a reprodukovatelná.

Podle těchto kritérií je třeba přistupovat k dalšímu zkoumání závislosti jednotlivých složek reakce a její avidity.

Jednou z poměrně stabilních částí reakce, na nichž se výše uvedená kritéria vztahují, je hemolytický amboceptor.

Použití hemolyzinu o vysokém titru umožňuje použít jednak malé množství komplementu, jednak vysoké ředění králíčího séra. Tím se sníží množství nespecifických bílkovin v reakci, které by mohly nepříznivě ovlivňovat aviditu reakce.

Běžně používané, komerčně vyráběné hemolyziny dosahují nízkých titrů, což nás vedlo k tomu, abychom se zabývali postupem přípravy amboceptorů, přezkoušeli několik imunizačních schemat a přispěli svými výsledky i jiným laboratorům.

Při hledání optimálního způsobu imunizace králíků, vedoucího k získání hemolytického amboceptoru o vysokém titru, jsme vycházeli ze staršího, avšak málo známého schematu používaného Čupíkem (1960) (viz tabulku I).

MATERIÁL A METODIKY

Králíci. Pro všechny pokusy jsme použili zdravé králíky plemene činčila velká. Celkem bylo použito 46 králíků, převážně samic, pouze v posledním pokuse bylo použito samců. Zvířata vážila v průměru 3 kg. Byla chována ve standardních klecích v dřevěné, velké, jednoduše zasklené králíkárně, bez možnosti vytápění. Pokusy probíhaly v různých ročních obdobích roku 1964 a 1965. Králíci byli krmeni zeleným krmivem, popř. senem, ovsem a kořenovou zeleninou, hlavně mrkví. Napájení byli *ad libitum* pouze po každém odběru krve, jinak bylo pro ně krmivo výhradním zdrojem vody.

Antigen. K imunizaci králíků bylo používáno konzervované beraní krve, resp. erytrocytů. Konzervy obsahující 50 % plné beraní krve a 50 % modifikovaného Alseverova citrátového roztoku připravuje podle návrhu Čupíka a Kunštýře a dodává Bioveta, n. p. Ivanovice na Hané. Pro intradermální imunizaci bylo používáno převážně této krve. K intravenóznímu podání byla užívána suspenze erytrocytů ve fyziologickém roztoku (0,87 % NaCl) získaných trojným propráním obsahu konzervy tímtež fyziologickým roztokem.

28. den, tj. 6 dní po poslední imunizaci, se králíci vykrvují. S nepodstatnými odchylkami bylo schema imunizace dodržováno v průběhu celé práce.

Imunizační dávka		Způsob aplikace, objem a charakter inokula		
pořadí	den	intrakutánně plnou krev	pauza	intravenózně prané erytrocyty
1	1.	0,5 ml	—	5% roztok — 5 ml
2	3.	0,5 ml	—	—
3	5.	0,5 ml	—	—
4	7.	0,5 ml	—	—
5	12.	0,5 ml	30 min.	5% roztok — 5 ml
6	17.	0,5 ml	30 min.	7,5% roztok — 7,5 ml
7	22.	0,5 ml	30 min.	10,0% roztok — 10 ml

Získávání a uchovávání vzorků. Vzorky krve byly od králíků získány z *vena saphena*. Vzorky séra uchovávány při 4° C, v několika případech při -30° C.

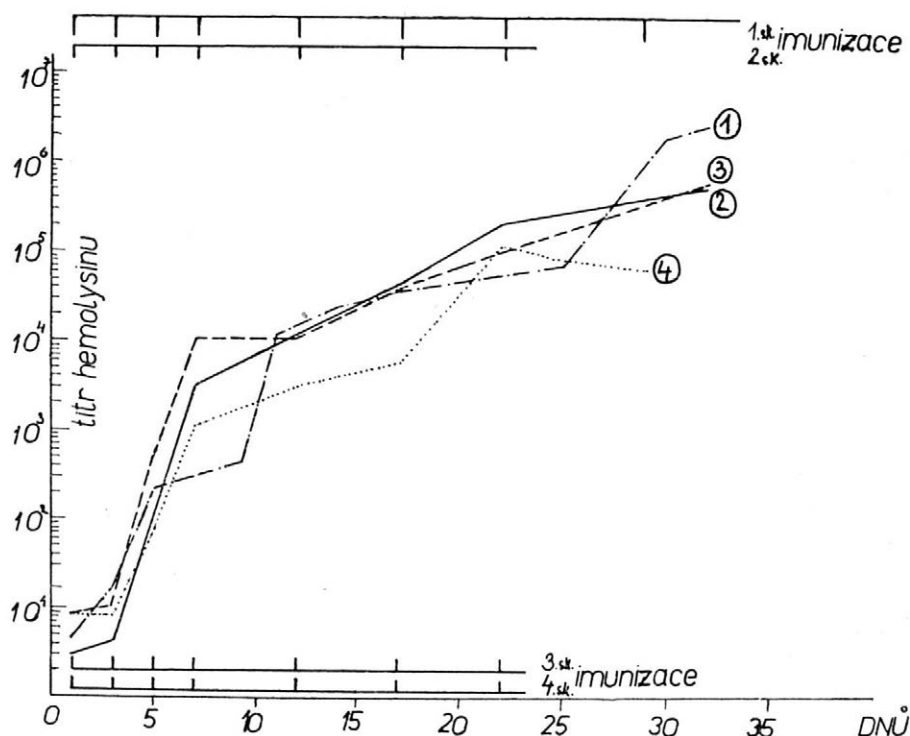
Stanovení hemolytické jednotky. Před vyšetřením byly vzorky sér inaktivovány 30 minut při +56° C. Bylo používáno vlastního morčecího nekonzervovaného komplementu, uchovávaného rovněž při -30° C. Krvinky byly získávány z uvedených konzerv beraní krve. Do reakce byl používán veronalový pufr připravený ze zásobního roztoku (*Acidum barbituricum* 5,75; *Natrium barbituricum* 3,75; NaCl 85; CaCl₂ bezvodý 0,28; MgCl₂ · 6 H₂O 1,68; *Aqua destil.* ad 2000) naředěním 1 dílu se čtyřmi díly destilované vody. Pufr má pH 6,8. Reakce byla prováděna podle uspořádání uveřejněného v dřívějším sdělení (Bozděch, 1965), pouze s tím rozdílem, že místo Formaplexových desek z umělé hmoty bylo používáno běžných zkumavek „wassermanek“.

VÝSLEDKY

1. pokusná serie. Jde o serii tří pokusů dohromady se čtyřmi pokusnými skupinami, celkem 17 králíků. Všichni tito králíci byli imunizováni podle původního schématu (viz tabulku I) s výjimkou 1. skupiny, která dostala navíc jednu imunizační dávku 29. den.

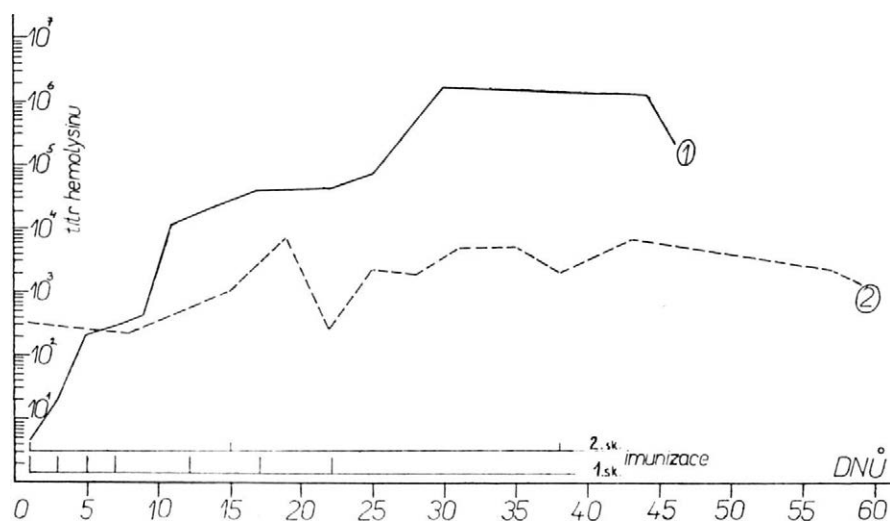
Proměnnou veličinou byla roční doba: skupina 1, byla imunizována v únoru a březnu 1964 v době, kdy byla silná zima (graf 1, křivka 1), skupina 2 a 3 v červenci a srpnu 1964 (křivka 2 a 3) a skupina 4 byla v pokuse v říjnu a listopadu 1964 (křivka 4). Od všech králíků byly získány kvalitní hemolyziny ve vysokých titrech. Titr hemolysinu je vyjádřen aritmetickým průměrem titrů všech členů skupiny (skupiny jsou 4) a znázorněn na obr. 1. Na grafu je patrná dynamika narůstání titru. Z této serie pokusů lze vyvodit, že roční doba nehraje významnou roli, pokud je ovšem zajištěna dostatečná a správná výživa i v zimě a o králíky je dobře pečováno.

2. pokusná serie. Při stanovení vhodného časového intervalu jsme vycházeli z vlastních zkušeností při získávání hyperimunního séra proti toxoplazmóze u krys, kdy se zdají být tři týdny optimální dobou k odběru séra od zvířat po primární imunizaci. V nedávné době referoval Fecsik a spol. (1964), že optimálním intervalem mezi dvěma antigenními stimuly u myši je 40 dní.



Obr. 1. Dynamika titru králičího hemolysinu v různých ročních obdobích při imunizaci ovčími erytrocyty podle základního imunizačního schématu. Jednotlivé křivky znázorňují aritmetické průměry jedinců ve skupině.

Křivka 1 = 1. skupina (5 králíků) imunizovaná v únoru a březnu 1964
 2 = 2. skupina (4 králíci) imunizovaná v červenci a srpnu 1964
 3 = 3. skupina (4 králíci) imunizovaná v červenci a srpnu 1964
 4 = 4. skupina (4 králíci) imunizovaná v říjnu a listopadu 1964



Obr. 2. Srovnání dynamiky titru králičího hemolysinu při imunizaci v intervalu 2 týdnů (a více) = křivka 2 (5 králíků) a při imunizaci podle základního schématu = křivka 1 (5 králíků)

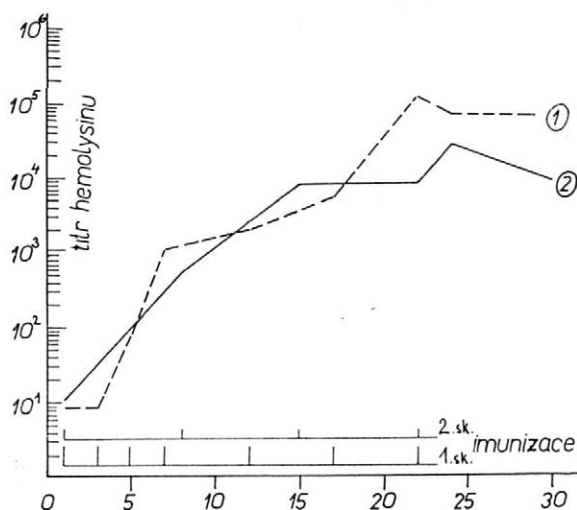
Den pokusu	1.	2.	3.	4.	5.	6.	7.	8.	9.	10.	11.	12.	13.	14.
Základní imun. schéma	i		i		i		i					i		
Zhuštěné imun. schéma první	i		i		i		i				i			
Zhuštěné imun. schéma druhé	i		i		i		i			i				i

i — imunizace
V — vykrmení králíků

V prvním pokuse dostala skupina pěti králíků antigen v množství a úpravě odpovídající první imunizační dávce výchozího schématu (tabulka I), a to třikrát v intervalu zhruba dvou týdnů. Jako kontrola sloužila skupina imunizovaná podle výchozího schématu, zahrnutá v grafu 1 jako skupina 1. Výsledek znázorňuje obr. 2. Z grafu je patrné, že interval dvou týdnů je u králíků při použití ovčích erytrocytů jako antigenu nevhodný k získání séra o vysokém titru.

V druhém pokuse byl zkrácen interval mezi dávkami antigenu na jeden týden. Imunizace byly 4. Úprava antigenu a způsob podání při první a druhé imunizaci pokusné skupiny souhlasil s první a pátou imunizací kontrolní skupiny (skupina znázorněna jako skupina 4 v prvním grafu). Třetí a čtvrtá imunizace odpovídala 6. a 7. imunizaci u kontrolní skupiny. Výsledek je znázorněn na obr. 3. Ukazuje se, že optimální interval mezi jednotlivými imunizacemi je zřejmě kratší než 1 týden.

3. pokusná serie. V této serii byly provedeny dva pokusy se změněným imunizačním schématem, a sice „zhuštěným“ od páté imunizační dávky. Navíc byla u jedné skupiny přidána jedna imunizace, a to 24. den pokusu. Obě pokusná schémata se navzájem odlišují jen v detailech, což spolu s odchylkou od výchozího schématu znázorňuje tabulka II.



Obr. 3. Srovnání dynamiky titru králíčího hemolysinu při imunizaci v intervalu 1 týden = křivka 2 (4 králíci) a při imunizaci podle základního schématu = křivka 1 (4 králíci)

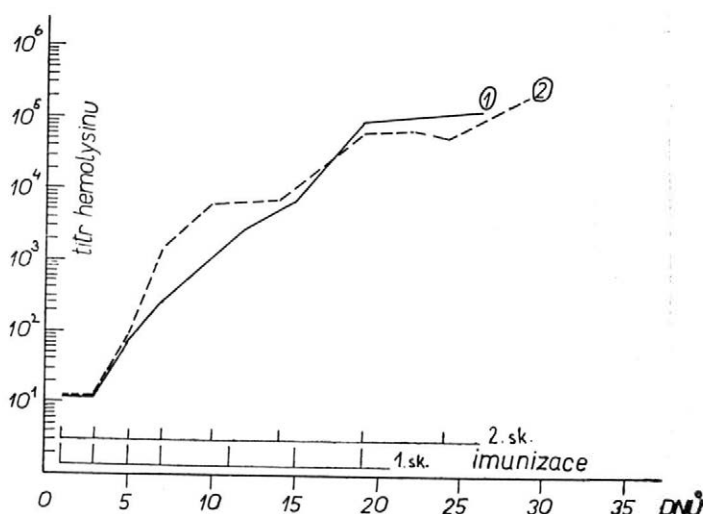
15.	16.	17.	18.	19.	20.	21.	22.	23.	24.	25.	26.	27.	28.	29.	30.
i		i		i			i		V				V		
				i					i					V	

Výsledky obou pokusů se zhuštěným imunizačním schematem znázorňuje obr. 4. Z grafu je patrná značná podobnost dynamiky titru obou pokusných skupin při zhuštěném imunizačním schematu. Obě křivky jsou srovnatelné s křivkami titrů při výchozím imunizačním schematu (graf 1). Rozdíly jsou nevýznamné. Zdá se, že toto schema nezvyšuje titr u imunizovaných králíků, i když by bylo třeba pro přesnější vyjádření pozdějšího odběru. V obou případech mají křivky ještě ku konci vzestupný charakter.

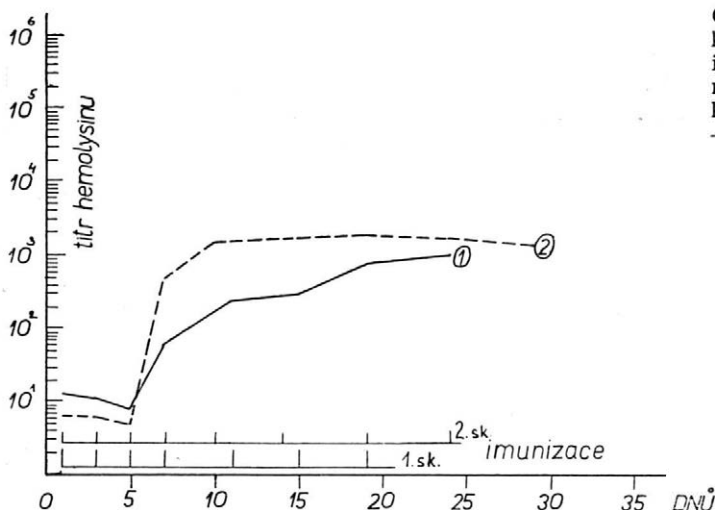
Při těchto dvou pokusech byl také ověřován vliv pohlaví na imunitní odpověď: k prvnímu pokusu bylo použito samic a ke druhému samců. Soudě podle grafického znázornění dynamiky titru obou skupin, není podstatný rozdíl v imunitní odpovědi u samic a samců.

4. pokusná serie. Zahrnuje dva pokusy, ve kterých jsme se snažili ověřit vliv způsobu podání antigenu na protilátkovou odpověď při opakované imunizaci.

V prvním pokuse bylo srovnáváno zhuštěné imunizační schema s imunizací podle téhož schematu, avšak s vynecháním všech čtyř intravenózních aplikací antigenu. Snížil se tím sice celkový objem podaného antigenu, přesto však lze soudit, že tento způsob, tj. samotná intradermální imunizace — nehledě na



Obr. 4. Dynamika titru králičího hemolysinu při užití zhuštěného imunizačního schématu. Srovnána dynamika titru u samic a u samců. Křivka 1 = 1. skupina — 5 králíků, samic
Křivka 2 = 2. skupina — 5 králíků, samců



Obr. 5. Dynamika titru králičího hemolysinu při imunizaci intradermální — křivka 1 (5 králíků) a intramuskulární — křivka 2 (5 králíků)

jeho spornou proveditelnost při použití větších objemů antigenu — nemůže sám o sobě, bez kombinace s intravenózním podáním, zajistit dostatečný titr hemolysinu. Výsledek znázorňuje křivka 1 v obr. 5.

Ve druhém pokuse jsme srovnávali zhuštěné imunizační schema s imunizací podle stejného schematu, avšak s tím rozdílem, že všechny intravenózní aplikace antigenu byly nahrazeny intramuskulárními. V tomto případě byly přesně dodrženy stejné objemové poměry, takže do organismu králíků se dostalo objemově stejné množství antigenu.

Výsledek znázorňuje křivka 2 v grafu 5. Je zřejmé, že intramuskulární aplikace antigenu není v tomto případě vhodná k získání hemolysinu o vysokém titru.

Aby bylo možno naše výsledky lépe hodnotit, požádali jsme dr. Závadovou, která spolupracuje s dr. Slonimem, aby přešetřila několik našich vzorků amboceptoru metodou, kterou uvádí Slonim v knize „Mikrobiologické vyšetřovací metody“ (1958) a podle které pracuje u nás celá řada sérologických laboratoří. Zatím byly srovnány 4 vzorky, což však, doufáme, pro orientační srovnání postačí. Výsledek je uveden v tabulce III.

III.

Vzorek hemolytického amboceptoru		1	2	3	4
Titr	stanovený postupem podle Bozděcha	300 000	152 000	240 000	76 000
	stanovený postupem podle Slonima	20 000	16 000	20 000	10 000

Jelikož stejného postupu, kterého použila dr. Závadová, používá při ohodnocování svých komerčně vyrobených amboceptorů ÚSOL, znamená to, že nejlepší vzorky námi připraveného amboceptoru mají asi dvojnásobný až desetinásobný titr proti hemolysinům dosud vyráběným.

DISKUSE

Výsledky experimentů potvrzují výhodnost kombinace intradermálního a intravenózního podání antigenu — beraních krvinek — pro přípravu králičího hemolyzinu s vysokým titrem. Vhodnost staršího imunizačního schématu stanoveného pravděpodobně na podkladě úvahy a empirie byla ověřena experimentálně.

Intradermální aplikace antigenu, užívaná při imunizacích relativně zřídka, vychází z úvahy, že při shodném embryonálním původu pokožky a CNS (ektoderm) lze očekávat intenzivnější stimulaci tvorby protilátek, jestliže se intravenózní podání kombinuje s intradermálním. Primární kontakt organismu s antigenem při první imunizační dávce (tabulka I.) je mohutnější. Tři další, výhradně intradermální imunizační dávky — druhá až čtvrtá podle tabulky I. — napomáhají v době induktivní fáze a počátku produktivní fáze tvorby protilátek adaptaci organismu na antigenní podnět. Poslední tři intradermální aplikace antigenu při páté až sedmé imunizaci spadají do doby intenzivní tvorby protilátek a mají působit desenzibilizačně, tj. mají zabránit tomu, aby se zvířata bezprostředně po aplikaci vysokých dávek antigenu nedostala do šokového stavu.

V našich pokusech nebyly dosud vyčerpány všechny dílčí otázky. Mimo jiné je třeba vyzkoušet některé další způsoby aplikace antigenu a ověřit tak některé literární údaje, které uvádějí, že intraperitoneální podání je poněkud výhodnější (Dra-per, Süssdorf 1957).

Dále je třeba stanovit experimentálně nejvhodnější kvantum antigenního inokula a vyzkoušet různé úpravy antigenu, jako je používání stromat hemolyzovaných erytrocytů, event. zahrátých.

Vzhledem k tomu, že stanovování hemolytické jednotky a sérologické metodiky vůbec nejsou mezinárodně standardizovány, uvádějí různí autoři různé postupy a výsledky pak jsou obtížně srovnatelné. Domníváme se, že námi zavedený postup (Bozděch 1965) má určité výhody a proto jej používáme. Tento postup používá geometrické titrační řady, kde sousední zkumavky se liší obsahem hemolyzinu zhruba o 26 %, jak bylo naznačeno i u Bengtsona (1944) a Friedmana (1960) a pečlivě propracováno Schmidt-Burbachem a Schwartzem (1965). Druhým poznatkem sledujícím reprodukovatelnost výsledků titrace je ta okolnost, že zjištěná jednotka amboceptoru jako nejvyšší ředění amboceptoru, které zcela hemolyzuje příslušný hemolytický systém za přítomnosti komplementu, je jednotkou jen relativní, která je do jisté míry v nepřímé závislosti na obsahu komplementu. Thom-sen (1910) uvádí, že zvýšení hodnot amboceptoru může vést ke snížení hodnot komplementu, podobně již Noguchi (1923) a Málek a Raška (1939) uvádějí, že komplement a amboceptor se do jisté míry vzájemně doplňují. Doporučujeme proto používat k titraci amboceptoru takového množství komplementu, jehož další zvýšení nevede k většímu zcitlivění krvinek hemolytického systému k amboceptoru. Používáme ve shodě s řadou autorů titraci amboceptoru v přítomnosti nadbytku komplementu (Takaki, Bonis a Koref 1926, Cohn 1936, Eaton a Rickard 1941 a Morenz a Rommel 1964).

V dosavadních pokusech jsme pro jednoduchost neuvažovali individuální váhu králíků při každé imunizaci, takže skutečné množství antigenu připadající na jednotku váhy se u jednotlivých zvířat poněkud lišilo. To je jedno z vysvětlení pro individuální rozdíly. Kromě toho má řada dalších faktorů vliv na individuálně rozdílnou protilátkovou odpověď. Uvedme alespoň některé: pohlavní cyklus, kondice zvířete, výživný stav a krmivo, podmínky okolí, jako je teplota, vlhkost, světlo, psychické faktory, sociální faktory (otázka počtu zvířat v kleci), roční doba a řada dalších nejmenovaných a také neodhalených faktorů. Samozřejmě, že prvořadý význam má zdravotní stav zvířete. Domníváme se, že vliv ročního období a pohlaví nehraje takovou roli, jako vliv dobré výživy, kondice, ustájení a zacházení se zvířaty.

ZÁVĚR

Na modelu králičího hemolyzinu proti beraním krvinkám byly experimentálně sledovány různé variance hyperimunizačního postupu: vliv časového intervalu, způsobu aplikace, roční doby, pohlaví. Bylo navrženo hyperimunizační schéma zajišťující získání hemolytického amboceptoru pro vazbu komplementu

s titrem 2 až 10krát vyšším než má dosud vyráběný, obchodně dodávaný amboceptor. Schema imunizace, která trvá 28 dní, má 7 intradermálních a 4 intravenózní aplikace antigenu.

Došlo dne 30. 12. 1965

Literatura

BENGSTON, I. A.: Complement fixation in the rickettsial diseases - technique of the test = „Publ. Hlth. Rep.“ 59, 1944 : 402-405. — BOZDĚCH, V.: Bemerkungen zur Methodik der Komplementbindungsreaktion = „Zschr. Immun.-Forsch.“ 128, 1965 : 483-498. — COHN, A.: The gonococcus complement fixation test. = J. lab. clin. Med.“ 22, 1936 : 627-637. — ČUPÍK, J.: Nepublikované údaje, 1960. — DRAPER, L. R. - SÜSSDORF, D. H.: The serum hemolysin response in intact and splenectomized rabbits following immunization by various routes = „J. inf. Dis.“ 100, 1957 : 147-161. — EATON, M. D. - RICKARD, E. R.: Application of the complement fixation test to the study of epidemic influenza = „Am. J. Hyg.“ 33, 1941 : 23. — FECSIK, A. L. - BUTLER, W. T. - COONS, A. H.: Studies on antibody formation. XI. Variation in the secondary response as a function of the length of the interval between two antigenic stimuli = „J. exp. Med.“ 120, 1964 : 1041-1049. — FRIEDMAN, H. S.: Simplification of certain aspects in the performance and interpretation of complement-fixation tests = „Am. J. clin. Pathol.“ 33, 1960 : 264-267. — MÁLEK, I. - RAŠKA, K.: Eaglový modifikace reakcí na lues = „Čas. Lék. čes.“ 78, 1939 : 732-740. — MORENZ, J. - ROMMEL, L.: Untersuchungen über einige Fehlerquellen bei der Komplementbindungsreaktion = „Zschr. ges. Hyg. Grenzgeb.“ 10, 1964 : 148-161. — NOGUCHI, H.: Laboratory diagnosis of syphilis. A manual for students and physicians. New York, Hoeber 1923. — SCHMIDT-BURBACH, A. - ŠVARC, P.: Zur Technik der Komplementbindungsreaktion unter besonderer Berücksichtigung des Toxoplasma-Antigens = „Zschr. Immun.-Forsch.“ 128, 1965 : 189-200. — SLONIM, D.: Úvod k serologickému vyšetřování v mikrobiologii. In: Kolektiv autorů: Mikrobiologické vyšetřovací metody. Praha, Stát. zdrav. nakl. 1958, s. 75-107. — SLONIM, D. - SLONIMOVÁ, M.: Příspěvek k diagnostice chřipky vazbou komplementu = „ČEMI“ 5, 1956 : 125-131. — TAKAKI, J. - BONIS, A. - KOREF, O.: Die Komplementablenkung mittels Kaltantigene als Methode zur Identifizierung und Differenzierung der filtrierbaren Virus = Zschr. Immun.-Forsch.“ 47, 1926 : 431-440. — THOMSEN, O.: Die quantitative Ausführung der Wassermannscher Reaktion = „Zschr. Immun.-Forsch.“ 7, 1910 : 389.

Приготовление и титрация гемолитического амбоцетора высокого титра

На модели кроличьего гемолизина против бараньих кровяных телец в экспериментальном порядке изучались различные варианты гипериммунизирующего процесса: влияние интервала времени, способа введения, времени года, пола. Была предложена гипериммунизационная схема, обеспечивающая получение гемолитического амбоцетора для связи комплемента с титром, большим в 2—10 раз, чем до сих пор вырабатываемый и находящийся в продаже амбоцетор. Схема иммунизации, продолжающейся 28 дней, рассчитана на 7 внутрикожных и 4 внутривенных введений антигена.

Preparation and Titration of a Hemolytic Amboceptor of a High Titre

In a model of rabbit hemolysin against sheep erythrocytes different variations of the hyperimmunization procedure were investigated experimentally: the influence of the time interval, of the method of application, of the time of year, and of the sex. A hyperimmunization scheme was suggested ensuring the obtaining of a hemolytic amboceptor for the complement fixation reaction with a titre from 2 to 10 times higher than is that of the hitherto produced and commercially supplied amboceptor. The immunization scheme lasting for 28 days includes 7 intradermal and 4 intravenous applications of the antigen.

Adresy autorů:

Ivo Kunstýř, prom. vet. lékař, Veterinární výzkumné středisko, Praha-Motol, MUDr. Václav Bozděch, Serologická laboratoř Neurologické kliniky akad. Hennera, Praha

■ Všeobecně se soudí, že novorozený savec není imunologicky zcela neschopný, i když v neonatální imunitní odpovědi může existovat jistá kvantitativní insuficience (Smith 1960). Četné pokusy ukázaly, že doba vzniku prvních protilátek u mláďat závisí na kvalitě a množství použitého antigenu a zpožděná tvorba protilátek není pravděpodobně způsobena jen neschopností mláďat reagovat na antigen, ale především tím, že je zpomalena syntéza sérových bílkovin (Šterzl, Říha 1957, Hoerlein 1957).

LITERÁRNÍ PŘEHLED

Další pokusy (Šterzl 1960) potvrdily, že selata normálně i předčasně narozená jsou schopna tvořit protilátky i když syntéza protilátek je u nich pomalejší, než u dospělých; její začátek však nezávisí na absolutním vyžrání mláďat, ale na tom, kdy se poprvé setkají s antigenem.

Pokusy, prokázat tvorbu protilátek ještě v době intrauterinního života byly u bovinních fetů při použití živé suspenze leptospir úspěšné (Fennestad a Borg-Petersen 1957), u prasečích fetů, po aplikaci antigenu *S. paratyphi* B nebo *B. suis*, neúspěšné (Šterzl a spol. 1960).

Další práce (Silverstein a spol. 1963) zaměřené na ověření imunogenní aktivity mláďete v průběhu intrauterinního vývoje ukázaly značné rozdíly mezi jednotlivými antigeny. Autoři zaznamenali signifikantní tvorbu protilátek u ovčího plodu již 66. a 77. den březosti, po aplikaci bakteriofágu X, zatím co difterický toxoid, *Salmonella typhosa* a BCG se ukázaly neúčinné.

Také kolostrální výživa ovlivňuje nesporně aktivní tvorbu protilátek u mláďat domácích zvířat jak v kladném, tak i záporném smyslu. (Hoerlein 1957, Jerne 1955, 1960, Segre a Kaerberle 1962).

V předchozí práci (Menšík, Žerníček 1963) jsme upozornili na to, že normálně, sáním odchovávaná selata jsou schopna tvořit cirkulující protilátky proti virovému antigenu podstatně dříve než po aplikaci antigenů bakteriálních.

Po podkožní a intraperitoneální aplikaci živého viru *Influenzae suis* jsme zaznamenali signifikantní titry protilátek již ve věku 7–10 dnů. Tvorba těchto protilátek není tedy závislá na tvorbě vlastního g-globulinu a kolostrem pasivně přijatý „nespecifický“ g-globulin není příčinou inhibice tvorby těchto protilátek.

Mohutnou protilátkovou odpověď jsme zaznamenali zejména u selat, která se během manipulace s antigenem spontánně infikovala. Snažili jsme se tedy v další serii pokusů objasnit závislost protilátkové odpovědi selat na přítomnosti antigenu v plicní tkáni, kde se virus rychle rozmnožuje a zvyšuje tak intenzitu antigenního podráždění.

Modelový pokus takto sestavený, odpovídá podmínkám přirozené infekce vnímavých selat ihned po narození, v silně zamořeném prostředí a umožňuje sledovat imunitní odpověď v průběhu rozvíjejícího se infekčního procesu.

MATERIÁL A METODIKA

Jako antigen byla použita alantoidní tekutina kuřecích embryí (KE), infikovaných laboratorním kmenem *Influenzae suis* (M 1957).

Pokusná selata, stejně jako v dřívějších pokusech pocházela od zdravých prasnic, nakoupených v chovu prostém respiračních infekcí. Infikovali jsme je bezprostředně po narození, ještě před napitím kolostra, dávkou 10×10^6 KE ID₅₀. Pro aplikaci antigenu jsme zvolili techniku intranazální infekce v hluboké chloroformové narkóze tak, že virus byl zvolna vkapáván střídavě do obou nosních otvorů a přítomnost tekutiny v plicích byla kontrolována auskultací.

SLEDOVÁNÍ DYNAMIKY PROTILÁTEK A MNOŽSTVÍ VIRU V PLICÍCH

Selatům jsme odebrali krev před napitím a do 48 hod. po napití kolostra a pak v jedno i vícedenních časových intervalech. Krevní séra jsme vyšetřovali na přítomnost HI a VN protilátek orientačně do 2–3 dnů po odběru, zbytky sér, uložené při -10°C byly vyšetřeny po skončení pokusu.

HI protilátky jsme zjišťovali modifikovanou Hirst-Salkovou metodou na plotnách z plexiskla v 0,4 ml systému proti 8 HA na jednotku viru (M e n š í k 1960). VN protilátky byly stanoveny metodou podle Horvatha v suspendovaných TK v otáčivých zkumavkách, proti 1000 ID₅₀ viru.

Obsah viru v plicích jsme stanovili titrací 10% suspenze plicní tkáně selat, usmrcených za různě dlouhou dobu po infekci, na KE, a výpočtem podle Reada a Muencha.

VÝSLEDKY

Předkládané výsledky zahrnují pokusy na 2 vrzích selat od prasnic prvníček, serologicky negativních, které byly ve třetím měsíci březosti převedeny na ústav a drženy v přísné izolaci od ostatních prasat.

Výsledky jsou přehledně uvedeny v tabulkách a v grafech.

Po experimentální infekci vnímavých selat, bezprostředně po narození, se virus v plicích rychle pomnožuje a maximálního titru dosahuje do 30 hodin po infekci. Vysoký obsah viru v plicích je pak zjišťován až do čtvrtého dne po infekci. Od pátého dne množství viru v plicní tkáni postupně klesá tak, že od 10. dne se dá virus prokázat jen v neředěné 10% suspenzi plicní tkáně a často teprve po 2–3 slepých pasážích.

Tvorba protilátek nastupuje obdobně jako po parenterální aplikaci viru již v prvních dnech po infekci a významné titry HI a VN protilátek jsou v jednotlivých případech prokazovány za 5–7 dní po narození (viz tab. I a II). Dynamika protilátek v prvních týdnech života je vyznačena na grafu 1. Vztah hladiny protilátek k obsahu viru v plicní tkáni v různých fázích vývoje patologického procesu je vyznačen na grafu 2.

I. Průkaz cirkulujících HI a VN protilátek po experimentální infekci selat ihned po narození

Sele č.	Stáří selat ve dnech a titr HI a VN protilátek														
	0	1 HI VN	2 HI VN	3 HI VN	4 HI VN	6 HI VN	8 HI VN	11 HI VN	12 HI VN	17 HI VN	18 HI VN	21 HI VN	30 HI VN	45 HI VN	60 HI VN
343	injekce po narození	— —													
347		— —	— —												
340		— —	— —												
342		— —		— —											
339		— —			— —										
337		— —				64+ 32									
346		— —			16 8		64 8	512+ 32							
338		— —						256 64	256 512	1024+ 512					
341		— —				— 16	32 32		512 256		128+ 256				
348		— —			8	32 32	128 64	512 512		4096 512	4096 512	4096 1024	1024+ 2048		
345		— —		— —			32 8	128 32			128 128			128+ 256	
344		— —	— —			32 8	64 16	128 64			256 128	512 1024	1024 1024		1024+ 512

Legenda: + sele usmrceno.

II. Průkaz cirkulujících HI a VN protilátek po experimentální infekci selat ihned po narození

Sele č.	Stáří selat ve dnech a titr HI a VN protilátek														
	0 HI VN	1 HI VN	2 HI VN	5 HI VN	6 HI VN	7 HI VN	9 HI VN	11 HI VN	14 HI VN	16 HI VN	25 HI VN	27 HI VN	37 HI VN	55 HI VN	65 HI VN
349a	— +														
351	— —	— —	— —	32+ 8											
352	— —	16 —	— —		— —	— 16	+								
354	— —	— —	— —	— 4	32 8	128 16	256 64	256 64	128+ 128						
350	— —	— 4	— 4	16 4	32 16	512 64	1024 256	256 128	128 128	1024 256	4096 512	4096+ 512			
353	— —	— —	— —	16 8		64 32	256 64	256 64	128 64	128 32	1024 64	2048 128	256 128	256 512	128 256
355	— —	— —	— —	— 32			256 128	256 64	64	32 64	64 64	64 64	128 512	4096 1024	1024 256
357	— —	— —	— —	16				32	32	16	16	128			
358	— —			32				32	16	16	16	128	128	128	16

Legenda: + sele usmrceno.

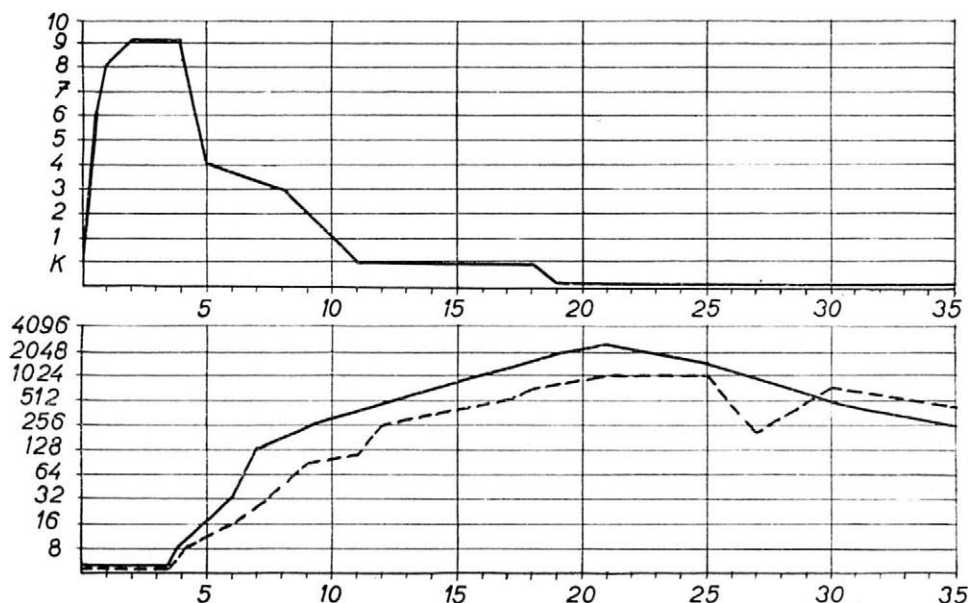
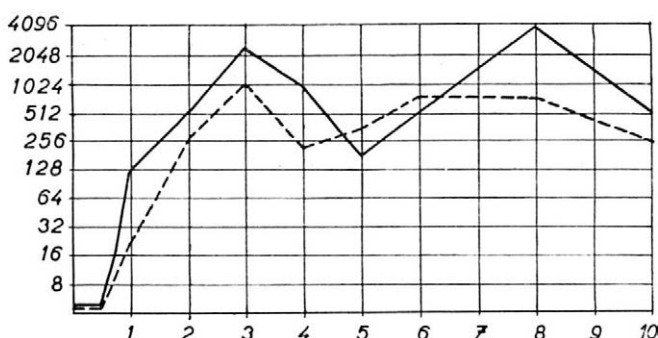
* sele usmrceno za 12 hodin po infekci.

Obr. 1. Tvorba protilátek u selat po experimentální infekci virem *Infl. suis* bezprostředně po narození.

osa x: stáří selat
v týdnech

osa y: průměrné hodnoty
v titru protilátek

— protilátky HI
----- protilátky VN



Obr. 2. Obsah viru v plicní tkáni a hladina protilátek u selat po experimentální infekci virem *Influenzae suis* bezprostředně po narození.

osa x: stáří ve dnech

osa y dole: titr protilátek

osa y nahoře: infekční titr 10% suspence plicní tkáně (log KE JD₅₀)

— protilátky HI
----- protilátky VN

ZHODNOCENÍ VÝSLEDKŮ A DISKUSE

Uvedené výsledky jsou v souladu s názory, že doba vzniku prvních protilátek u mláďat závisí na množství a kvalitě použitého antigenu (Šterzl a Říha 1957). Tyto kvantitativní rozdíly se uplatňují i u antigenů, které se přirozeně osazují v organismu a rozmnožují se intenzivně v tkáních (*E. coli*). Celkové množství antigenu je pak v podstatě vyšší, než antigenu uměle vpraveného (Šterzl 1960). Je pravděpodobné, že střevní lymfatická tkáň reaguje na antigen *E. coli* mimořádně citlivě (Šterzl, Kostka a spol. 1960). Předpokládáme, že také živý virus *Influenzae suis* se v plicní tkáni uplatňuje jako antigen, stimulující tvorbu protilátek mnohem účinněji než po aplikaci parenterální.

Rozdíly v kvalitě použitého antigenu se ukázaly rozhodující v pokusech o vyvolání tvorby protilátek u fetů. V souhlase s pracemi Silversteina a spol. (1963), který dokázal tvorbu protilátek u ovčích fetů jen proti bakteriofágu X, zatím co difterický toxoid, *Salmonella typhosa* a BCG se ukázaly neúčinné, předpokládáme, že příčinou rozdílů v délce indukční fáze tvorby protilátek u mláďat imunizovaných v různých stádiích postnatálního vývoje, může být vedle množství i druh použitého antigenu. Protilátková odpověď na virový nebo fágový antigen je zřejmě mnohem časnější než na antigeny bakteriální.

Při hodnocení aktivní tvorby protilátek u selat po narození musí být brán v úvahu způsob odchovu selat a jejich výživa; vzhledem k tomu, že ve své práci jsem používal jen selata normálně odchovaná a kolostrum živěná, u nichž se mohla ve smyslu Jerneho teorie (Jerne 1955, Burnet 1959) uplatnit preformovaná protilátka stejně jak se snažili dokázat ve svých pokusech Segre a Kaerberle (1962), nemohu vlastní výsledky srovnávat s pracemi autorů, kteří experimentovali se selaty bezkolostrálními. Do jaké míry se „nespecifický“ kolostrální gamaglobulin podílí na tvorbě protilátek proti antigenu *Influenzae suis* nedá se na základě výsledků referovaných pokusů rozhodnout. Tvorba vlastních protilátek v tak raném období postnatální ontogenézy může být vysvětlována přítomností nespecifického kolostrálního gama-globulinu nebo preformované protilátky, která svou biochemickou skladbou patří do jiné bílkovité frakce krevního séra, nebo schopností selat tvořit gama-globulin samostatně hned po narození.

ZÁVĚR

V modelových pokusech jsme sledovali aktivní tvorbu protilátek u selat, tradičně (sáním) odchovávaných, po intranazální aplikaci živého viru *Influenzae suis* bezprostředně po narození.

Virus se v plicích rychle pomnožuje a nejvyšších titrů ($10^{8.9}$ KE ID₅₀) dosahuje již za 30 hodin po infekci. Tato vysoká hladina viru, která se udržuje v plicích až do 4. dne po infekci, zajišťuje mohutnou antigenní stimulaci a vyvolává tvorbu protilátek, které jsou zjišťovány v signifikantních titrech již u selat 5 dní starých. Od pátého dne po infekci titr viru v plicích rychle klesá, úměrně s vzestupem hladiny protilátek.

Došlo dne 30. 12. 1965

Technická spolupráce: Marie Hájková

Literatura

1. BARRICK, E. R. - MATRONE, G. - OSBORNE, J. C.: Effects of Administering Various Blood Serum Constituents on Gamma Globulin Level of Baby Pigs = „Proc. Soc. Exp. Biol. Med.“, 7, 1954, s. 92-97. — 2. BURNET, F. M.: Immunity and Virus Infection, Edited by V. A. Najjar, p. 1, John Wiley and Son, New York, 1959. — 3. EARLIE, I. P.: 1935, citov. ŠTERZL, J.: Prvé stupně tvorby protilátek (induktivní fáze). Babákova sbírka sv. 18. Praha, SZN, 1960, s. 133. — 4. FENNESTAD, K. L. — BORG-PETERSEN, C.: Leptospira Antibody Production by Bovine Foetuses. = „Nature“, 180, 1957, s. 1210-1211. — 5. HOERLEIN, A. B.: The Influence of Colostrum on Antibody Response in Baby Pigs. = „J. Immunol.“, 79, 1957, s. 112-117. — 6. JACOBSEN, P. E. — MONSTGAARD, L.: Investigation of the Serum Proteins in Pigs from Birth to Maturity = „Nord. Vet. Med.“, 2, 1950, s. 812-824. — 7. JERNE, N. K.: The Natural-Selection Theory of Antibody Formation = „Proc. Nat. Acad. Sci.“, 41, 1955, s. 849-857. — 8. JERNE, N. K.: Immunological Speculations. = „Am. Rev. Microbiol.“, 14, 1960, s. 341-358. — 9. MENŠÍK, J.: Tvorba a dynamika protilátek při chřipce prasat. I. Vliv kolostrálních protilátek na imunitní odpověď selat v prvních měsících života. = Sborník ČSAZV, Veterinární Medicina, 5, (XXXIII), 1960, č. 7-8, s. 599-610. — 10. MENŠÍK, J. — ŽERNÍČEK, D.: Tvorba a dynamika protilátek při chřipce prasat. II. Aktivní tvorba protilátek u selat v raném postnatálním období. = „Vědecké práce VÚVL v Brně“, 1963, s. 133-140. — 11. NORDBRING, F. — OLSSON, B.: Electrophoretic and Immunological Studies on Sera of Young Pigs. I. Influence of Ingestion of Colostrum on Protein Pattern and Anti-

body Titre in Sera from Suckling Pigs and the Changes throughout Lactation. = „Acta Soc. Med. Upsal.“, 62, 1957, s. 193-212. — 12. PAVLOVIČ, D. - RISTOVIČ, L. - TRUMIČ, P. - ŠIBALIĆ, S. - PANJEVIĆ, D.: Electrophoretic Examination of Serum Proteins of Pigs = „Acta Vet. Belgrad. Fasc.“, 4, 1959, č. 9, s. 65-76. — 13. PAYNE, L. C. - MARSCH, C. L.: Gamma Globulin Absorption in the Baby Pig: The Non-selective Absorption of Heterologous Globulin and Factors Influencing Absorption Time = „J. Nutrit.“, 76, 1962, s. 151-158. — 14. RUTQUIST, L.: Electrophoretic Patterns of Blood Serum from Pig Fetuses and Young Pigs = „Amer. J. Vet. Res.“, 19, 1958, s. 25-31. — 15. SEGRE, D. - KAEHERLE, M. L.: The Immunologic Behavior of Baby Pigs. I. Production of Antibodies in Three-Weeks old Pigs = „J. of Immunol.“, 88, 1962, s. 782-789. — 16. SILVERSTEIN, A. M. - UHR, J. W. - KRAMER, K. L.: Fetal Response to Antigenic Stimulus. II. Antibody Production by the Fetal Lamb. = „J. of Exp. Med.“, 117, 1963, č. 5, s. 799-812. — 17. SMITH, R. T.: (Discussion) = Mechanisms of Antibody Formation. Proceedings of a Symposium. Holub M., Jarošková L. Praha, ČSAV, 1960, s. 148. — 18. SOKOL, A. - ROSOCHA, J. - MILAR, A.: Dynamika bílkovin séra ošipáných v postnatálním období ontogeny, sledovaná elektroforeticky = „Veter. časopis“, 4, 1955, s. 139-152. — 19. ŠTERZL, J.: Prvé stupně tvorby protilátek (Induktivní fáze). Babákova sbírka, sv. 18, SZN, Praha, 1960, s. 133. — 20. ŠTERZL, J. - KOSTKA, J. - MANDEL, L. - ŘÍHA, I. - HOLUB M.: Development of the Formation of Gamma-Globulin and of Normal and Immune Antibodies in Piglets Reared without Colostrum. = Mechanisms of Antibody Formation. Proceedings of a Symposium. Holub M., Jarošková L. Praha, ČSAV, 1960, s. 130-145. — 21. ŠTERZL, J. - ŘÍHA, K.: 1957, citov. ŠTERZL, J.: Prvé stupně tvorby protilátek (Induktivní fáze). Babákova sbírka sv. 18, Praha, SZN, 1960, s. 22. — 22. WELLMANN, G. - ENGEL, H.: Immunologische Untersuchungen an künstlich aufgezogenen Ferkeln. I. Mitteilung: Über das Serum-Eiweißbild bei steril geborenen, ohne Kolostralmilch aufgezogenen Ferkeln in den ersten Lebensmonaten. II. Mitteilung: Vergleich der Antikörper mit der Gamma-Globulin-Bildung bei steril geborenen, kolostralmilchfrei augezogenen Ferkeln. III. Mitteilung: Über die Fähigkeit neugeborener Ferkel, Antikörper und Gamma-Globulin aus der Kolostralmilch zu resorbieren. = „Zbl. f. Bakt.“, I. Orig. 190, 1963, s. 243-261, 262-276, 409-414.

Образование и динамика антител при гриппе свиней

IV. Реакция антител после экспериментального инфицирования новорожденных поросят

В модельных опытах изучалось активное образование антител у поросят, выращенных традиционным способом (на подсосе), вследствие введения в нос живого вируса *influenzae suis* непосредственно после их рождения:

В легких вирус быстро размножается, наибольших титров ($10^{8.9}$ KE ID₅₀) он достигает уже спустя 30 час. после инфицирования. Этот высокий уровень вируса, сохраняемый в легких вплоть до 4-го дня после инфицирования, обеспечивает сильную антигенную стимуляцию и вызывает образование антител, встречающихся в значительных титрах уже у 5-дневных поросят. Начиная с 5-го дня после инфицирования титр вируса в легких быстро понижается пропорционально повышению уровня антител.

The Forming and the Dynamics of Antibodies in the Case of Enzootic Bronchopneumonia of Pigs

IV. The Antibody Response after Experimental Infection of Newly-Born Piglets

By means of model experiments we investigated the active forming of antibodies in piglets reared in the traditional way (suckling) after intranasal application of the live virus of influenza suis immediately after birth.

In the lungs the virus propagates rapidly and reaches the highest titres ($10^{8.9}$ KE ID₅₀) already 30 hours after infection. This high level of the virus, which is maintained in the lungs up to the 4th day after infection, ensures a strong antigenic stimulation and brings about the forming of antibodies, which are determined in significant titres already in piglets of an age of 5 days. Beginning from the 5th day after infection the titres of the virus in the lungs decreases rapidly in proportion to the ascending of the level of antibodies.

Die Bildung und Dynamik der Antikörper bei der Schweinegrippe

IV. Die Antikörperreaktion nach experimenteller Infektion neugeborener Ferkel

In Modellversuchen verfolgten wir die aktive Bildung der Antikörper bei den auf übliche Weise (durch Saugen) aufgezüchteten Ferkeln, nach intranasaler Applikation des lebendigen Virus influenzae suis unmittelbar nach der Geburt.

Das Virus vermehrt sich in der Lunge schnell und erreicht die höchsten Titer bereits nach 30 Stunden nach der Infektion. Dieses hohe Virusniveau, das sich in der Lunge bis zum 4. Tag nach der Infektion erhält, gewährt eine mächtige antigene Stimulation und ruft die Bildung von Antikörpern, die in signifikanten Titern bereits bei 5 Tage alten Ferkeln festgestellt werden, hervor. Vom fünften Tag nach der Infektion senkt sich der Virustiter in der Lunge rasch, und zwar proportionell mit der Erhöhung des Antikörperrniveaus.

Adresa autora:

Doc. MVDr. Jaromír Menšík, CSc., Výzkumný ústav veterinárního lékařství,
Brno-Medlánky

OBSAH

Žuffa A.: Imunologická problematika vo veterinárnej medicíne	279
Salajka E.: Příspěvek k problematice escherichios (koliinfekci) u selat v raném postnatálním období	283
Hubík R., Lázníčka F., Barek B.: Koncentrované saponinové vakcíny proti slintavce	
I. Výroba a studium účinnosti monovalentní saponinové vakcíny proti slintavce	295
Šrubař B., Jiranová M.: Příspěvek ke studiu specifické kolostrální imunity u telat od krav vakcínovaných proti slintavce a kulhavce	
I. Sdělení — průkaz seroneutralizačních protilátek	303
Žák O.: Vliv hyaluronidázy na disperzi vakcinačních zárodků a nástup imunity po očkování živou červenkovou vakcínou z kmene WR 2	311
Černík K.: Vliv teploty na hemaglutinační aktivitu a infekciozitu některých kmenů NDV	
I. Možnost charakteristiky kmenů různé virulence pomocí inaktivace teplem	321
Kunstýř I., Bozděch V.: Příprava a titrace hemolytického amboceptoru o vysokém titru	329
Menšík J.: Tvorba a dynamika protilátek při chřipce prasat	
IV. Protilátková odpověď po experimentální infekci novorozených selat	337

СОДЕРЖАНИЕ

Салайка Е.: К вопросу проблематики escherichios (колиинфекций) у поросят в ранний период после рождения (293). — Губик Р., Лазниčka Ф., Барек Б.: Концентрированная сапониновая вакцина против ящура. I. Производство и изучение эффективности одновалентной сапониновой вакцины против ящура (301). — Шрubaрж Б., Иранова М.: К вопросу исследования специфического молозивного иммунитета у телят от вакцинированных против ящура коров (309). — Жак О.: Влияние гиалуронидазы на дисперсию вакцинных зародышей и на создание иммунитета после прививки живой вакциной рожи штамма WR2 (319). — Черник К.: Влияние температуры на геммагглютинационную активность и инфекционность некоторых штаммов вируса ньюкаслской болезни NDV. I. Возможность характеристики штаммов разной вирулентности при помощи инактивации теплом (328). — Кустирж И., Боздех В.: Приготовление и титрация гемолитического амбоцептора высокого титра (336). — Меншик Я.: Образование и динамика антител при гриппе свиней. IV. Реакция антител после экспериментального инфицирования новорожденных поросят (343).

CONTENT

Salajka E.: On the Problem of Escherichioses (Coli-Infections) in Piglings in the Early Post-Natal Period (293). — Hubík R., Lázníčka F., Barek B.: A Concentrated Saponin Vaccine applied against the Foot-and-Mouth Disease I. Production and Study of the Effectiveness of a Monovalent Saponin Vaccine against the Foot-and-Mouth Disease (301). — Šrubař B., Jiranová M.: On the Study of Specific Colostral Immunity of Calves of Cows that had been Vaccinated against the Foot-and-Mouth Disease (310). — Žák O.: Influence of Hyaluronidase on the Dispersion of the Vaccination-Germs and on the Onset of Immunity after the Vaccination with Live Swine-Erysipelas Vaccine of the WR 2-Strain (320). — Černík K.: The Influence of Temperature on the Hemagglutination Activity and on the Infectiveness of some NDV Strains. I. The Possibility of a Characterization of Strains of Differing Virulence by means of Inactivation through Heat (328). — Kunstýř I., Bozděch V.: Preparation and Titration of a Hemolytic Amboceptor of a High Titre (336). — Menšík J.: The Forming and the Dynamics of Antibodies in the Case of Enzootic Bronchopneumonia of Pigs. IV. The Antibody Response after Experimental Infection of Newly-Born Piglings (343).

INHALT

Salajka E.: Beitrag zur Problematik der Escherichiosen (Coliinfektionen, bei Ferkeln während des frühen postnatalen Zeitraumes (294). — Hubík R., Lázníčka F., Barek B.: Die konzentrierte Saponin-Vakzine gegen die

Maul- und Klauenseuche. I. Die Erzeugung und das Studium der Wirksamkeit der monovalenten Saponin-Vakzine gegen die Maul- und Klauenseuche (302). — Šrubař B., Jiranová M.: Beitrag zum Studium der spezifischen Kolostral-Immunität bei Kälbern und Kühen, die gegen die Maul und Klauenseuche vakziniert wurden (310). — Žák O.: Einfluß der Hyaluronidase auf die Dispersion der Vakzinationskeime und auf den Eintritt der Immunität nach der Impfung mit lebendiger Rotlaufvakzine aus dem Stamm WR 2 (320). — Černík K.: Der Einfluß der Temperatur auf die Hämagglutinationsaktivität und Infektiosität einiger Newcastle-Krankheit-Virusstämme (NDV). I. Die Möglichkeit der Charakteristik der Stämme von verschiedener Virulenz mittels der Inaktivierung durch die Wärme (res. E/328). — Kunštýř I., Bozděch V.: Die Zubereitung und Titration des hämolytischen Ambozeptors von hohem Titer (res. E/336). — Menšík J.: Die Bildung und Dynamik der Antikörper bei der Schweinegrippe. IV. Die Antikörperreaktion nach experimenteller Infektion neugeborener Ferkel (344).

TABLE DES MATIÈRES

Salajka E.: Contribution au problème des escherichioses (coli-infections) chez les porcelets dans la période postnatale précoce (res. An/293, Al/294). — Hubík R., Láznická F., Barek B.: Vaccin concentré de saponine contre la fièvre aphteuse. I. Production et étude de l'efficacité du vaccin monovalent de saponine contre la fièvre aphteuse (res. An/301, Al/302). — Šrubař B., Jiranová M.: Contribution à l'étude de l'immunité spécifique colostrale des veaux nés des vaches vaccinées contre la fièvre aphteuse (res. An/310, Al/310). — Žák O.: Influence de l'hyaluronidase sur la dispersion des germes de vaccins et sur le début de l'immunité après l'inoculation d'un vaccin vivant rouget de la souche WR 2 (res. An/320, Al/320). — Černík K.: Influence de la température sur l'activité d'hémagglutination et la faculté d'infection de certaines souches de NDV (res. An/328). — Kunštýř I., Bozděch V.: Préparation et titration de l'ambocepteur hémolytique d'un titre élevé (res. An/336). — Menšík J.: Formation et dynamique des anticorps au cours de la grippe des porcs (res. An/343, Al/344).