

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA



7

ROČNÍK 13 (XLI)
PRAHA,
ČERVENEC 1968
CENA 10 Kčs

ÚSTŘEDÍ ZEMĚDĚLSKÉHO A POTRAVINÁŘSKÉHO VÝZKUMU

ÚSTAV VĚDECKOTECHNICKÝCH INFORMACÍ

VETERINÁRNÍ MEDICÍNA

Řídí redakční rada

Prof. MVDr. Emanuel Král, (předseda), prof. MVDr. Koloman Boďa, DrSc., doc. MVDr. Jan Čarvaš, CSc., prof. MVDr. Jaroslav Dražan, CSc., MVDr. Miroslav Dvořák, CSc., prof. MVDr. Tomáš Gdovin, MVDr. Miloš Halaša, CSc., prof. MVDr. Antonín Holub, DrSc., doc. MVDr. Jozef Hrušovský, CSc., MVDr. Martin Lis, CSc., MVDr. Andrej Mačička, MVDr. Ladislav Polák, CSc., MVDr. Jiří Srna, prof. MVDr. Oldřich Svoboda, doc. MVDr. ing. Jan Vlček, prof. MVDr. Jaroslav Vrtiak, DrSc., doc. MVDr. Alojz Žuffa, CSc.

Vedoucí redaktor František Němec

© Ústav vědeckotechnických informací, Praha 1968

■
Vědecký časopis VETERINÁRNÍ MEDICÍNA uveřejňuje studie, rozbor a vědecká pojednání o vyřešených úkolech výzkumu z oboru veterinární medicíny. Vydává Ústav vědeckotechnických informací. 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 ветеринарии. Издаёт Институт научнотехнической информации. 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. 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. 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. Paraît une fois par mois. Rédaction Prague 2, Slezská 7

TESTOVÁNÍ PATOGENITY VIROVÝCH KMENŮ NEWCASTLESKÉ CHOROBY NA HOLUBECH

V. Kabelík

Státní veterinární ústav, Český Brod

KABELÍK, V. *Testování patogenity virových kmenů Newcastleeské choroby na holubech*. Vet. Med. (Praha) 13 (7) : 385—392, 1968.

Autor píše o možnostech diferenciací virových kmenů ND biologickou testací na holubech. Velogenní, mezogenní a lentogenní kmeny lze rozlišit na skupinách holubů infekcí *i. c.*, *i. m.*, případně *i. v.* Kalkulační indexy patogenity (IP) pro jednotlivé způsoby infekce lze zjistit i stupeň patogenity vzájemným porovnáním kmenů příslušného typu. IP *i. c.* u mezogenních kmenů dosahuje po 13denní pozorovací době průměru 5 s rozmezím 3,5—8,2, u velogenních kmenů se snižuje průměr na 2,5 s rozmezím 1,8—3,5. Hodnotu větší než 14 lze považovat za spolehlivý indikátor lentogenního kmene B₁. Hodnoty IP *i. m.* v pozorovací době 8 a 13 dnů nebyly u mezogenních kmenů konečné a pohybovaly se v rozmezí $\leq 8,8 - 9$ ($\leq 12,8 - 14$). U velogenních kmenů jsou hodnoty konečné a většinou menší než 8. Zatímco velogenní kmeny po *i. m.* infekci holubů vyvolávají letální onemocnění, mezogenní kmeny ve většině případů nezpůsobí onemocnění. V malém procentu mohou způsobit obrny bez poruchy celkového zdravotního stavu a jen v ojedinělých případech smrt.

Newcastle; patogenita virových kmenů; diferenciací virových kmenů.

Při diagnostice onemocnění chovů drůbeže s afekcemi lokalizovanými převážně v horních cestách dýchacích, byl často izolován virus Newcastleeské choroby (ND). Anamnesticky bylo prokázáno, že izolované kmeny nebyly často v kauzální souvislosti s tak zvanými postvakačními reakcemi (Kabelík, Meisner 1967). Bylo proto nutno pokusit se o bližší identifikaci těchto kmenů podle jejich patogenity. Pokusy v tomto směru konané a užitečné pro epizootologické studie spočívají v možnostech diferenciací vakcinačního viru, a to lentogenního a mezogenního typu, od velogenních, epizootologicky významných virových kmenů ND. Tyto práce vycházejí ze zkušeností, které předložili Hanson (1956), Oláh (1962), Nitzsche (1960) a Tóth (1966). Je podáno sdělení o zkouškách stupně patogenity izolovaných kmenů viru ND, prováděných v porovnání s lentogenními, mezogenními a velogenními kmeny na holubech po intracerebrálních (*i. c.*), intramuskulárních (*i. m.*) a intravenózních (*i. v.*) infekcích.

MATERIÁL A METODY

VIROVÉ KMENY: a) Izolované kmeny

Pracovali jsme se 6 kmeny, které byly izolovány při epizooticky probíhajících onemocněních drůbeže za příznaků afekcí horních cest dýchacích, poklesu užitkovosti, případně zvýšené mortality. Pro biologické pokusy byly použity kmeny pasážované na 11denních kuřecích embryích (KE), a to kmen

1650/90—65 se 37—39 pasážemi, kmen 5040/339—66 se 3 pasážemi, kmen 3482/264—66 se 4 pasážemi, kmen 4438/317—66 se 4 pasážemi, kmen 7296/1067—66 se 3 pasážemi a kmen 7378/304—65 s 5—6 pasážemi.

b) Mezogenní a lentogenní kmeny nám poskytla Bioveta, n. p., Nitra. Hertfordshire kmen (H-virus), op. č. 149, lyofilizovaný byl přepasážován na 11denních kuřecích embryích (KE) a v biologických pokusech užit ve 2. a 3. pasáži.

Kmen Roakim, op. č. 120, lyofilizovaný, byl přepasážován na 11denních KE a v biologických pokusech užit ve 2. a 3. pasáži.

Kmen B₁ — Hitschner, op. č. 121, byl přepasážován na 11denních KE a v biologických pokusech užit v 1. a 2. pasáži.

c) Velogenní kmeny. Kmen 6491/184—64 byl izolován z případů perakutně probíhající nákazy v chovu drůbeže soukromého sektoru za typických klinických příznaků, epizootického průběhu a patologicko—anatomického nálezu. V biologických pokusech byl užit v 5.—6. pasáži na 11denních KE.

Kmen V—90—162/2 byl poskytnut Sbírkou zoopatogenních mikroorganismů VÚVL v Brně v lyofilizovaném stavu. Virus byl přepasážován na 11denních KE a pro biologické pokusy užit ve 2. a 3. pasáži.

Kmeny 720/62, 570/63 a 3974/60 byly poskytnuty laskavostí dr. Dvořákové*). Po přepasážování na 11denních KE byly pro biologické testy užity ve 2. pasáži. Celkový počet pasáží nebyl znám. Kmen 720/62 byl izolován z koroptve, kmen 570/63 byl izolován ze zmrazených slepic dovezených z Číny a kmen 3974/60 byl izolován z bažanta.

Kmeny 720/62 a 3974/60 pocházejí z lokalit, kde pseudomor drůbeže proběhl za klinických příznaků a patologicko—anatomických nálezů, typických pro tuto nákazu.

Virové kmeny byly skladovány v 1 ml ampulích při + 4 °C. Před použitím pro biologickou testaci byly provedeny 1—2 pasáže na 11denních KE, stanoven jejich hemaglutinační (HE) titr a TKID₅₀ na kuřecích embryonálních buňkách. HE—titr se pohyboval v rozmezí 1 : 1024—1 : 2048, TKID₅₀ byl stanoven u všech studovaných kmenů kromě kmene B₁ a dosahoval hodnoty 10⁹/1 ml—10¹⁰/1 ml.

KUŘECÍ EMBRYA

Pro pomnožení viru ND byla užívána výhradně 11denní KE. KE byla infikována intraallantoidně dávkou 0,2 ml allantoidní tekutiny, po 48hodinové inkubaci byla allantoidní tekutina odebrána, zjištěn HA—titr a TKID₅₀.

BIOLOGICKÉ POKUSY

Experimenty byly provedeny na 224 holubech různého stáří a rasy. Předem byla od všech odebrána krev pro vyloučení přítomnosti HA—protilátek. Holubi byli infikováni *i. c.*, *i. m.* a *i. v.* Pro každý způsob infekce u každého studovaného kmene byla sestavena skupina pokusných zvířat v počtu 5 kusů, u Roakim a H—viru, stejně jako u kmenů 1650/90—65 a 6491/184—64 byly *i. m.* a *i. v.* infekce provedeny na skupinách 8—9 holubů. Čerstvě odsáté

*) SVÚ Brno.

allantoidní tekutiny KE s pomnoženým virem byly ředěny $2 \cdot 10^{-1}$ Earlovým roztokem a pro infekce byly stanoveny jednotné dávky, a to pro *i. m.* a *i. v.* 5,0 ml, pro *i. c.* aplikaci 0,05 ml. Pozorovací doba byla 13 dní. U kmenů 1650/90—65 a 7378/304—65 byla patogenita, stanovená na holubech, porovnána s patogenitou u jednodenních kuřat. Kuřata ve skupinách po 5 kusech byla infikována *i. peritoneálně* à 0,2 ml a *i. c.* à 0,05 ml viru ve zředění 10^{-1} . Pozorovací doba byla 8 dní. Výsledky jsou uvedeny v tabulce IIa.

TKAŇOVÉ KULTURY

Pro kalkulaci TKID₅₀ byly zakládány zkumavkové kultury KEB z 11ti denních KE trypsinizační technikou podle Dulbecco a Vogtové (1954). Růstové medium představovala směs Parkerova a Earlova roztoku s 0,5 % laktalbuminhydrolysátu, v poměru 1 : 1, s 5 % telecího séra.

KALKULACE INDEXŮ PATOGENITY (IP)

Přidrželi jsme se kalkulace zavedené Hansonem (1956) a použité Nitzchem (1960), která byla vypracována pro rozlišení kmenů viru ND podle jejich patogenity pro jednodenní kuřata. IP u holubů jsme vypočítali pro každý způsob infekce z případů onemocnění a úhynů pokusných zvířat v závislosti na čase, vždy po 8—13 dnech po infekci. Všichni v této době přežívající nemocní nebo zdraví holubi byli následujícího dne po uzavření pokusu zařazeni do skupiny holubů uhynulých, respektive onemocnělých a uhynulých a IP pro tyto případy byly označeny $\geq$; hodnoty tedy nebyly konečné, byly větší než uvedené. Pomocí IP jsou rozdíly v patogenitě virových kmenů snadno porovnatelné.

VÝSLEDKY POKUSŮ

V celkovém pozorovacím období 13 dnů byl denně zaznamenáván průběh infekce se zřetelem ke stanovení časového limitu nástupu klinických příznaků a úhynu u každého holuba příslušné pokusné skupiny. Výsledky získané po *i. c.*, *i. m.* a *i. v.* infekci ke 13. dnu po infekci v řadě případů upřesnily výsledky kalkulované k 8. dni pozorovací doby.

Po intracerebrální infekci vzájemným porovnáním mezogenních, velogenních a námi izolovaných kmenů, vzhledem k charakteru onemocnění, nenacházíme signifikantní rozdíly. Všechny kmeny vyvolaly klinické projevy encefalitidy s letálním průběhem. Pouze kmen 7378/304—65 byl výjimkou a odlišoval se v patogenitě od ostatních kmenů zřetelně prodlouženou inkubační dobou (7 dnů) a sníženou patogenitou; z 5 infikovaných holubů zůstal jeden bez klinických příznaků a ze 4 zbylých byl letální průběh encefalitidy zaznamenán pouze u 2 holubů, a to ještě v prodloužené pozorovací době 13 dnů, zatímco u dalších dvou vznikly irreparabilní změny v CNS s příznaky odpovídajícími jejich lokalitě. Tento kmen byl izolován v chovu kuřic, u kterých byly zjištěny příznaky ztíženého dechu. Denní ztráty však nevykazovaly zřetelné úchyly od ztrát běžných. *I. c.* infekce virem B₁ proběhla bez poruchy zdravotního stavu. U velogenních kmenů bylo v porovnání s mezogenními kmeny pozorováno zkrácení inkubační doby o 1—3 dny, na 1—2 dny.

Pozoruhodný je však průběh onemocnění po intramuskulární a intravenózní infekci. Zatímco infekce mezogenními a námi izolovanými kmeny proběhla ve většině případů bez příznaků, velogenní kmeny vyvolaly smrtelné probíhající onemocnění provázené somnolencí a encefalickými příznaky. Z porovnání kmene 3974/60 s kmeny standardními předpokládáme, že tento kmen ztratil svoje původní patogenní vlastnosti a po 8leté údržbě se chová jako kmen mezogenní. *I. m.* a *i. tracheální* infekce slepice tímto kmenem proběhla během 2 dnů za příznaků mírných afekcí horních cest dýchacích, zatímco kontrolní infekce velogenním kmenem 720/62 vyvolala u druhé slepice po inkubační době 5 dnů těžké irreparabilní poruchy CNS. Mezogenní kmeny po *i. v.* infekci způsobily onemocnění u 30 % a úhyn u 10 % infikovaných holubů, po *i. m.* infekci se toto procento snížilo na 17 % onemocnělých a 6 % uhynulých. Ta onemocnění, jejichž průběh nebyl letální, se ve většině případů omezila na afekce CNS — s příznaky lokálních paralýz — bez celkových poruch zdravotního stavu. Procentuální zastoupení zdravých, nemocných a uhynulých holubů po *i. m.* a *i. v.* infekci virových kmenů ND je uvedeno v tabulce I.

I. Procento nemocných, uhynulých a zdravých holubů po infekci mezogenními kmeny

Infekce	Nemocných uhynulých	Nemocných	Uhynulých	Zdravých
<i>i. m.</i>	17 %	11 %	6 %	83 %
<i>i. v.</i>	30 %	20 %	10 %	70 %
<i>i. c.</i>	98 %	5 %	93 %	2 %

i. m. infikováno 52 holubů

i. v. infikováno 46 holubů

i. c. infikováno 47 holubů

Indexy patogenity pro *i. c.*, *i. m.* a *i. v.* infekce (IPC, IPM, IPV) jsou velmi dobře porovnatelné a jsou uvedeny v tabulce II. Lze říci, že výsledky získané u izolovaných kmenů jsou v porovnání s výsledky získanými u mezogenních kmenů standardních, konformní a tyto kmeny lze proto zařadit podle jejich patogenních vlastností do skupiny mezogenních virů ND.

IPC ukazuje jistě, že však výrazné rozdíly v patogenitě velogenních a mezogenních kmenů. IPC mezogenních kmenů se pohybuje v rozmezí 3,5–8,2 s průměrem 5, IPC velogenních kmenů se pohybuje v rozmezí 1,8–3,5 s průměrem 2,5. Podle IPC lze spolehlivě odlišit lentogenní kmen B₁, který nezpůsobuje po *i. c.* infekci poruchy zdravotního stavu. Ve své patogenitě se poněkud lišily 2 izolované kmeny. Kmen 1650/90–65 jeví zvýšenou patogenitu jak při *i. c.*, tak také při *i. v.* a *i. m.* infekci proti ostatním porovnávaným izolovaným (mezogenním) kmenům. Tento kmen byl izolován v chovu drůbeže, která onemocněla za příznaků zřetelného ztíženého dýchání. U slepic klesla užitkovost o 87 % během 18 dnů, mortalita dosáhla 4 %. U kuřat se pohybovala morbidita mezi 80–90 %, mortalita dosáhla 18 %. Na druhé straně kmen 7378/304–65 se zřetelně odlišuje sníženou patogenitou od ostatních porovnávaných izolovaných a standardních mezogenních kmenů a svými vlastnostmi má nejbližší ke kmenům apatogenním. Výrazné rozdíly v hodnotách IPM a IPV lze pozorovat mezi velogenními a mezogenními kmeny. Nejenom, že hodnoty IP jsou u velogenních kmenů podstatně nižší, ale, a to je podstatné, představují hodnoty konečné. Rozdíly mezi *i. m.* a *i. v.* infekcemi nejsou zřetelné, takže *i. v.* infekce nejsou pro zařazení zkoušených kmenů rozhodující.

II. Indexy patogenity po *i. c.*, *i. m.* a *i. v.* infekci holubů

Kmeny		<i>i. c.</i>		<i>i. m.</i>		<i>i. v.</i>	
		den 8	13	den 8	13	den 8	13
I	1650/ 90-65	3,5	—	≤ 8,8 ≤ 13,2		≤ 7,9 ≤ 10,9	
	5040/ 339-66	5,4	—	≤ 8,9 ≤ 12,8		≤ 8,0 ≤ 11,5	
	7296/1067-66	4,4	—	≤ 9,0 ≤ 14,0		≤ 8,0 ≤ 12,0	
	3482/ 264-66	4,6	—	≤ 9,0 ≤ 14,0		≤ 8,2 ≤ 12,2	
	4438/ 317-66	5,0	—	≤ 9,0 ≤ 14,0		≤ 8,9 ≤ 12,2	
	7378/ 304-65	≤ 8,2 ≤ 10,9		≤ 9,0 ≤ 14,0		≤ 9,0 ≤ 14,0	
M	Roakin	4,5	—	≤ 8,4 ≤ 12,3		≤ 8,8 ≤ 12,8	
	H-virus	2,8	—	≤ 8,3 ≤ 12,4		≤ 8,9 ≤ 13,5	
V	3974/ 60	2,5	—	≤ 9,0 ≤ 14,0		0	0
	6491/ 184-64	3,5	—	≤ 4,9 5,0		6,0	—
	V-90-162/2	1,8	—	≤ 5,5 5,7		3,8	—
	720/62	2,2	—	≤ 4,9 5,0		0	0
	570/63	2,4	—	≤ 5,6 6,2		0	0
L	B ₁	≤ 9,0 ≤ 14,0		≤ 9,0 ≤ 14,0		≤ 9,0 ≤ 14,0	

I — izolované kmeny, M — mezogenní kmeny, V — velogenní kmeny, L — lentogenní kmeny

IIa. Indexy patogenity kmenů 1650/90-65 a 7378/304-65 po *i. c.* a *i. perit.* infekci jednodenních kuřat

Kmeny	<i>i. c.</i>	<i>i. perit.</i>
1650/ 90-65	3,0	≤ 5,8
7378/304-65	≤ 6,5	≤ 7,5

Pozorovací doba 8 dní

DISKUSE

Předložená práce vychází z možností rozlišení virových kmenů Newcastleké choroby, které jsou často izolovány v chovech drůbeže. Metody pro diferenciaci vakcinačního viru jsou pro epizootologické studie bez pochyb velmi užitečné. Mezi velogenními, mezogenními a lentogenními kmeny mohou být rozdíly v hemaglutinační nebo hemolytické aktivitě, v citlivosti proti chemickým vlivům apod., avšak tyto rozdíly jsou většinou podmíněny kvantitativně. Rovněž ani metody vypracované pro stanovení rozdílů ve schopnosti usmrcovat KE (Hanson, Brandly 1955, Nitzsche 1960), nestačily na diferenciaci těchto kmenů, a proto se hledaly cesty další. Využitím rozdílů v infekciozitě, patogenitě nebo tkáňové afinitě byly dosaženy dobré výsledky intracerebrální infekcí jednodenních kuřat (Hanson 1956, Nitzsche 1960, Tóth 1966) nebo holubů (Oláh, Palatka 1962).

Sledováním časové závislosti jednotlivých případů onemocnění nebo úhynu kuřat, nebo sledováním pouhého počtu onemocnělých nebo uhynulých holubů, byly shledány rozdíly, porovnatelné formou tzv. neuropatogenního indexu.

Naše práce sledovala rozdíly v patogenitě kmenů viru ND na holubech po *i.c.*, *i.m.*, a *i.v.* infekcích, pro které byly vypočítány a porovnány indexy patogenity. Použití holubů pro tyto práce se ukázalo velmi výhodné. Tato pokusná zvířata na jedné straně citlivě odpovídají na různé způsoby parenterální infekce viru ND podle stupně jeho patogenity, na druhé straně v přirozených podmínkách, respektive po perorální infekci i silně patogenního kmene jsou velmi málo vnímavá (Reuss 1961). Vzhledem k tomu, že protilátková odpověď na virus ND v přirozených podmínkách je vzácná, dostává se nám do rukou biologický materiál pro biologickou testaci spolehlivější, než jaký představují jednodenní kuřata, u nichž je navíc pro snadný aerogenní nebo perorální přenos infektu přísná izolace jednotlivých pokusných skupin nutná. Při porovnání IPC mezogenních a velogenních kmenů viru ND lze pozorovat jisté rozdíly, podle kterých však nelze ještě provést konečné zařazení. Průměrná hodnota IPC u mezogenních kmenů po 13denní pozorovací době dosahuje průměru 5 a pohybuje se v rozmezí 3,5–8,2, u velogenních kmenů se pak snižuje průměr na 2,5 s rozmezím 1,8–3,5. IPC větší než 14 lze považovat za spolehlivý indikátor pro lentogenní kmen B1, který nemá schopnost pomnožit se v mozkové tkáni a vyvolat onemocnění. Ke stejným výsledkům dospěla řada autorů i u dalších lentogenních kmenů La Sota, F1 (Oláh 1962, Tóth 1966). Většina izolovaných kmenů odpovídala patogenitě Roakin viru, jehož střední hodnota IPC je 4,5. Pouze 2 kmeny se lišily ve svých biologických vlastnostech. Poměrně vysoká hodnota IPC $\leq 8,2$ ($\leq 10,9$) u kmene 7378/304-65 ukazuje na jeho velmi malou virulenci a stojí nejbližše kmenům apatogenním. Naproti tomu kmen 1650/90-65 se zřetelně nižší hodnotou IPC 3,5 se virulencí blíží H-viru nebo dokonce velogennímu kmenu 6491/184-64. Teprve po kalkulaci IPM nebo IPV lze provést konečné zařazení tohoto kmene do skupiny virů s odpovídajícími biologickými vlastnostmi pro mezogenní typ. Dosažené hodnoty vyšší než 8,8 (13,2) a 7,9 (10,9) zřetelně diferencují tento kmen od kmenů velogenních s hodnotami IPM 5,0–6,3 a IPV 3,8–6. Porovnání tohoto kmene s ostatními izolovanými kmeny ukazuje na jeho zvýšenou patogenitu. Konfrontací dosažených výsledků s průběhem onemocnění přirozeně infikované drůbeže 2 chovů bylo možno pozorovat podstatně zvýšenou virulenci kmene 1650/90-65 izolovaného v chovu B., proti kmenu 7378/304-65, který byl izolován v chovu V. Ostatní izolované kmeny způsobily v přirozeně infikovaných chovech rozličný průběh nákazy co do procenta poklesu užitkovosti, morbidity a mortality. Jejich hodnoty IPM a IPV, ležící těsně u sebe, byly konformní s hodnotami mezogenních kmenů (Roakin a H-viru). Ve skupině mezogenních kmenů našel podobné rozdíly ve stupni jejich patogenity Nitzche (1960), který prováděl pokusy na skupinách jednodenních, *i. c.*, případně *i. m.* infikovaných kuřat.

Z výsledků provedených pokusů je možno IPM u mezogenních a velogenních kmenů vyhodnotit takto: *I. m.* infekce holubů mezogenními kmeny ve většině případů, nevede k onemocnění, nebo podle stupně patogenity může u některých způsobit částečné nebo úplné obrny křídel a noh (u 11% infikovaných), bez dalších poruch zdravotního stavu. Jen v ojedinělých případech (6% infikovaných) může způsobit smrt. Znamená to, že u těchto kmenů hodnoty IPM nebyly v pozorovací době 8 a 13 dnů konečné a pohybovaly se v rozmezí $\leq 8,8-9$ ($\leq 12,8-14$). U velogenních kmenů v důsledku letálního onemocnění jsou hodnoty IPM konečné, třeba i v prodloužené pozorovací době 13 dnů, a i v tomto případě jsou většinou menší než 8. Pro potřeby veterinární praxe lze základní diferenciaci (určení typu) izolovaného kmene podle stupně jeho patogenity provést infekcí alespoň 4 holubů, z nichž 2 jsou infikováni *i. c.* a 2 *i. m.* Průběh onemocnění po různých cestách infekce, respektive kalkulace IPC, IPM, případně IPV dává na jedné straně možnost výběru velogenních kmenů, vhodných pro čelenž, na druhé straně lze sledovat postupnou ztrátu patogenity při mitigaci kmenů.

I. v. infekce a kalkulace IPV není pro základní diferenciaci kmenů zvlášť výhodná. Tato metoda vyžaduje provedení testace alespoň na dvojnásobném

počtu pokusných zvířat ve srovnání s infekcí *i. m.*, vzhledem ke zvýšenému procentu případů onemocnění (20 %) a zejména úhynu (10 %) po infekci mezogenními kmeny.

Rozdíly v patogenitě, respektive stupeň patogenity několika izolovaných kmenů v rámci jednoho typu, je pak možno pro epizootologické studie zjistit na skupinách pokusných zvířat v počtu nejméně 5, kalkulací IPC, případně IPM a IPV vzájemným porovnáním, případně porovnáním s kmeny standardními.

Technická spolupráce V. Cetlová a H. Váňová.

Došlo dne 21. 1. 1968

Literatura

1. DULBECCO R, VOGT M.: Plaque formation and isolation of pure lines with poliomyelitis viruses. = „J. Exper. Med.“, 99, 1954, 167-183.
2. V. KABELÍK, V. MEISNER: Mírné formy pseudomoru drůbeže „Veterinářství“, 1968, v tisku.
3. E. NITZSCHE, E. SCHMIDTDIEL: „Über die Unterscheidung und Charakterisierung von Virusstämmen der Newcastle-Krankheit.“ = „Berl. u. Münch. t. Wschr.“, 73, 148-153.
4. P. OLÁH, Z. PALATKA: Testing of the pathogenicity of strains of Newcastle disease virus by intracerebral infection of pigeons. = „Magy. Allatorv. Lap.“, zvl. č., 1962, 15-18.
5. U. REUSS: Die Empfänglichkeit der Haustauben für die atypische Geflügelpest. = „Mh. Tierheilk.“, 13, 1961, 153-155.
6. T. TÓTH: Neuropathogenicity of ND virus strains in day-old-chicks. = „Acta veter. acad. Sci. Hung.“ 16, 1966, 187-192.

KABELÍK V. (Gosudarstvennyj veterinarnyj institut, Česki Brod, Čechoslovakia). *Исследование патогенности вирусных штаммов ньюкастльской болезни на голубях.* Vet. med. (Praha), 13, (7) : 385-392, 1968.

V предложенной работе автор сообщает о возможностях дифференциации вирусных штаммов ND при помощи биологического исследования на голубях. Велогенные мезогенные и лентогенные штаммы можно отличить на группах голубей путем внутрикожной, внутримышечной, или же внутривенной инфекции. Калькуляцией индексов патогенности (ИП) для отдельных способов заражения можно также установить степень патогенности взаимным сравнением штаммов соответствующего типа. Индекс патогенности внутрикожного заражения достигает у мезогенных штаммов после 13 дней наблюдения в среднем 5, с пределом 3,5—8,2, у велогенных штаммов понижается среднее число до 2,5, с пределом 1,8—3,5. Величину выше 14 возможно считать надежным индикатором лентогенного штамма В1. Данные индекса патогенности внутримышечного заражения не оказались у мезогенных штаммов после 8 и 13 дневного наблюдения окончательными и колебались в пределах $< 8,8-9$ ($< 12,8-14$). У велогенных штаммов являются данные окончательными и большей частью ниже 8. Между тем как велогенные штаммы вызывают после внутримышечной инфекции голубей смертельное заболевание, мезогенные штаммы в большинстве случаев не вызывают заболевания. В незначительном проценте случаев они могут вызвать паралич без расстройства общего состояния здоровья и только в редких случаях падеж.

New-castle; патогенность вирусных штаммов; дифференциация вирусных штаммов.

KABELÍK, V. (State Veterinary Institute, Český Brod, Czechoslovakia). *Testing of the Pathogenicity of Virus Strains of the Newcastle Disease in Pigeons.* Vet. Med. (Praha) 13 (7) : 385—392, 1968.

The author reports on the possibilities of a differentiation of virus strains of ND by means of biological testation in pigeons. Velogenic, mesogenic, and lentogenic strains can be distinguished in groups of pigeons by means of i. c., i. m., or also

i. v. infection. By means of a calculation of the indices of apthogenicity (IP) for the different methods of infection it is possible to determine also the degree of pathogenicity by means of a mutual comparison of strains of the corresponding type. In the case of mesogenic strains IP i. c. reaches, after a 13 days' observation period, an average of 5 within limits of from 3.5 to 8.2, in the case of velogenic strains the average decreases to 2.5 within limits of from 1.8 to 3.5. A value exceeding 14 may be considered as a reliable indicator of the lentogenic B₁ strain. In the case of mesogenic strains the IP i. m. values in an observation period of 8 and 13 days were not final and ranged between limits of $\leq 8.8-9$ ($\leq 12.8-14$). In the case of velogenic strains the values are final and mostly smaller than 8. Whereas after i. m. infection velogenic strains induce in pigeons a lethal disease, mesogenic strains do not cause any disease in a majority of cases. In a small percentage they may cause paresis without any disturbance of the overall state of health and, only in single cases, death.

Newcastle; pathogenicity of virus strains; differentiation of virus strains.

KABELÍK, V. (Staatliches Veterinärinstitut, Český Brod, Tschechoslowakei). *Testung der Pathogenität der Virusstämme der Newcastle-Krankheit an Tauben*. Vet. Med. (Praha) 13 (7) : 385—392, 1968.

Der Autor befaßt sich mit den Möglichkeiten einer Differenzierung der Virusstämme der ND mittels der biologischen Testung an Tauben. Die velogenen, mesogenen und lentogenen Stämme können bei den Taubengruppen durch die i. c., i. m., eventuell durch die i. v.-Infektion unterschieden werden. Durch die Kalkulation der Indexe der Pathogenität (IP) für die einzelnen Infektionsarten kann man auch den Pathogenitätsgrad durch gegenseitigen Vergleich von Stämmen des betreffenden Typs ermitteln. Der IP i. c. bei mesogenen Stämmen erreicht nach einer 13-tägigen Beobachtungszeit einen Durchschnitt von 5 mit einer Spanne von 3,5—8,2, bei velogenen Stämmen wird der Durchschnitt auf 2,5 herabgesetzt, mit einer Spanne von 1,8—3,5. Den Wert über 14 kann man für einen verlässlichen Indikator des lentogenen Stammes B₁ halten. Die IP i. m.-Werte in einer Beobachtungszeit von 8 und 13 Tagen waren bei mesogenen Stämmen nicht endgültig und bewegten sich in einer Spanne von $\leq 8,8-9$ ($\leq 12,8-14$). Bei velogenen Stämmen gibt es endgültige Werte, die größtenteils kleiner als 8 sind. Während die velogenen Stämme nach einer i. m.-Infektion der Tauben eine letale Erkrankung hervorrufen, rufen die mesogenen Stämme in der Mehrheit der Fälle keine Erkrankung hervor. Sie können in einem geringen Prozent der Fälle Lähmungen ohne Störung des gesamten Gesundheitszustandes und nur in vereinzelt Fällen den Tod hervorrufen.

Newcastle; Pathogenität der Virusstämme; Differenzierung der Virusstämme.

Adresa autora:

MVDr. Václav Kabelík, Ústřední státní veterinární ústav, Praha, pracoviště Český Brod, Tuchorazská 500
Ředitel: MVDr. Š. Haladej, CSc.

MNOŽENÍ VIRU PSEUDOMORU DRŮBEŽE NA TKÁŇOVÝCH KULTURÁCH PŘI RŮZNÝCH TEPLOTÁCH

K. Černík, E. Černíková

Bioveta n.p., odd. vývoje a výzkumu, Nitra

ČERNÍK, K., ČERNÍKOVÁ, E. Množení viru pseudomoru drůbeže na tkáňových kulturách při různých teplotách. Vet. Med. (Praha) 13 (7) : 393—402, 1968. Množení kmenů B₁, La Sota, Roakin a jeho tkáňové linie R/TK₅₀, Hertfordshire, Miyadera a terénních 2455/6 a 366/4 bylo sledováno po dobu 120 hodin v jednovrstevné kultuře kuřecích embryonálních buněk při teplotě 30, 37 a 40 °C. U lentogenních kmenů se nepodařilo zaznamenat významný vzestup infekčního titru. Výtěžnost pomnoženého viru byla velmi nízká — 0,00025 — 0,6 infekčních jednotek na jednu buňku. U mezogenních a velogenních kmenů se zvyšující se teplotou zkracovala se doba latence i doba potřebná k dosažení maximálního titru ze 48—72 hod. při 30 °C na 18—24 při 37 °C a 12—18 hod. při 40 °C. Při 30 °C se titr udržoval na dosažené úrovni až do konce doby pozorování, ale při 37 a 40 °C docházelo k postupné inaktivaci viru, výraznější při vyšší teplotě. U linie R/TK₅₀ byly dosaženy vyšší titry než u původního vaječného kmene, ale postup inaktivace byl rychlejší. Výtěžnost viru na jednu buňku kolísala u mezogenních a velogenních kmenů od 2 do 750 infekčních jednotek, nejvyšší byla dosažena u kmene R/TK₅₀ a 2455/6 a při teplotě 37 °C. Cytopatogenní účinek se projevil při 40 °C po 36 hod., při 37 °C po 48 hod. a při 30 °C až po 120 hod.

lentogenní, mezogenní, velogenní kmeny; kuřecí embryonální buňky; doba latence; infekční titr; výtěžnost viru; inaktivace viru; cytopatogenní účinek.

Kvantitativní ukazatele množení viru pseudomoru drůbeže (Newcastle-ské nemoci, N. n.) v kuřecích zárodcích a tkáňových kulturách byly sledovány z různých hledisek a za různých podmínek kultivačního prostředí, teploty a pH. Praktické podmínky a okolnosti přípravy vakcin a jejich kontroly určovaly hlavní aspekty naší práce, jejímž úkolem bylo vyšetřit vliv inkubačních teplot pod a nad optimem na množení některých kmenů viru pseudomoru drůbeže v tkáňové kultuře kuřecích embryonálních buněk.

MATERIÁL A METODY

Virové kmeny: K pokusům jsme použili lentogenní kmeny B₁ a La Sota, mezogenní Roakin, jeho tkáňovou linii R/TK₅₀ a Hertfordshire, laboratorní kmen Miyadera a velogenní kmeny 2455/6 a 366/4. Všechny kmeny jsou jako sbírkové uchovávány v lyofilizovaném stavu. Před pokusem byly lyofilizované kmeny jednorázově přepasážovány v kuřecích zárodcích resp. tkáňové kultuře (R/TK₅₀) při 37 °C.

Tkáňové kultury: K pomnožení a titraci viru byly použity jednovrstevné kultury kuřecích embryonálních buněk (KEB) v Rouxových lahvích o obsahu 300 ml a ve zkumavkách. Jako zakládací medium bylo použito Earlovo medium s 5 % telecího séra a jako udržovací Parkerova me-

dium s 2 % telecího séra. Titrace viru byla prováděna ve zkumavkových kulturách KEB způsobem popsaným v předcházejících sděleních (Černík 1966, Černík, Černíková 1967).

Postup: V předběžném pokusu bylo sledováno množení kmene Roakin na tkáňových kulturách (TK) v Rouxových lahvích během jeho adaptace na kultury KEB, a to v 10., 12., 14., 16. a 40. pasáži. Vzorky byly odebírány v intervalu 24 hodin do 5 dní. Medium bylo slito, uloženo do mrazicího pultu a nahrazeno stejným objemem čerstvého. Po zmrazení při -14°C a rozmrazení bylo vyšetřeno zvlášť kultivační medium a zvlášť buňky v čerstvém mediu jednak titrací ve zkumavkových kulturách KEB a jednak hemaglutinačním testem.

K vlastnímu sledování byly použity zkumavkové kultury KEB: Třikrát 100 zkumavek s vytvořeným buněčným monolayerem bylo inokulováno po odsátí základního media ca 10 infekčními dávkami viru na 1 buňku, tj. dávkou 0,1 ml, obsahující 4×10^6 TKID₅₀ při koncentraci buněk 4×10^5 v 1 ml. Virus byl adsorbován 60 min. při 37°C . Potom byly zkumavky pětkrát propláchnuty 1 ml udržovacího media a po přidání 1 ml media bylo 100 zkumavek inkubováno při 30°C , 100 při 37°C a 100 při 40°C . Medium bylo přidáváno stříkačkou Cornwall o obsahu 5 ml a odsáváno sterilní pipetou, připojenou hadičkou k láhvi, z níž byl odsáván vzduch penicilinovým inhalátorem s agregátem.

Odběry vzorků byly prováděny po 2, 4, 8, 12, 18, 24, 36, 48, 72, 96 a 120 hodinách inkubace. Z každé pokusné série bylo odebráno po 8 zkumavkách. Ze 4 z nich bylo medium slito do připravených prázdných zkumavek a všechny vzorky byly označeny údajem o teplotě a době odběru, zkumavky obsahující jen medium i písmenem „V“ (volný virus) a zkumavky s plnou kulturou „C“ (celkový virus). Vzorky byly zmrazeny při -14°C . Před titrací byl obsah zkumavek rozmrazen a vzorky „V“ centrifugovány 10 min. při 3000 obr./min. Titrace obsahu infekčního viru ve vzorcích byla prováděna po slití shodných vzorků „V“, resp. „C“, ve zkumavkových kulturách KEB, inkubovaných při 37°C .

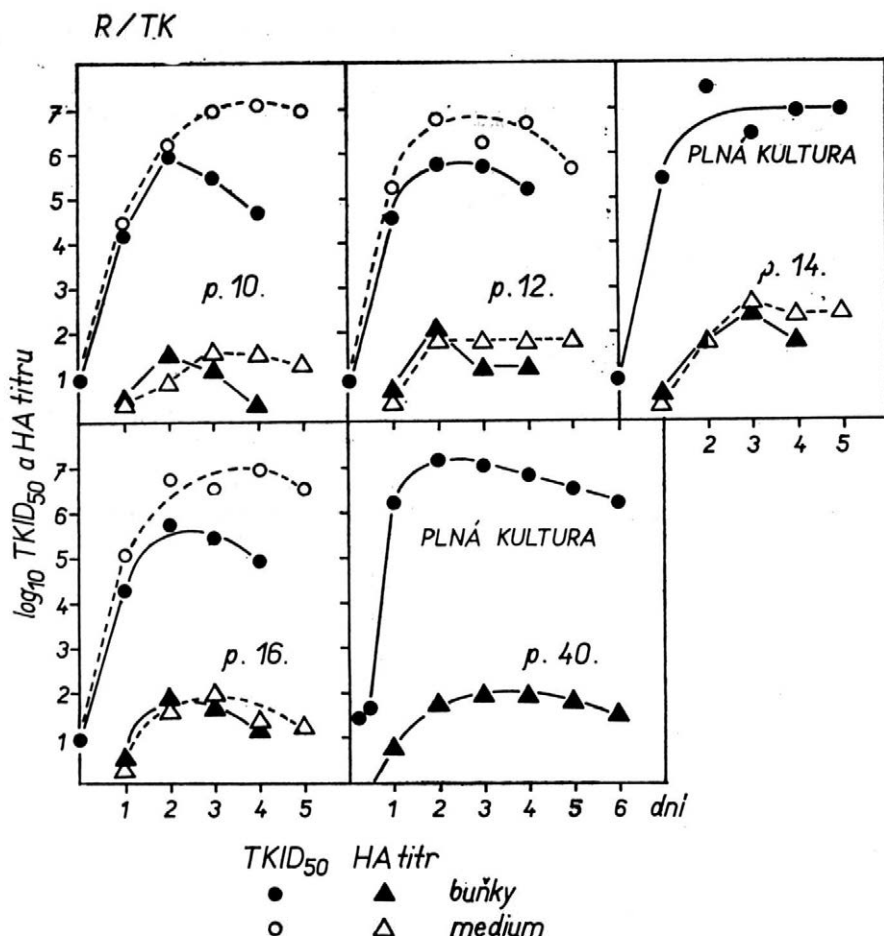
Po neúspěchu stanovení růstových křivek lentogenních kmenů popsaným způsobem byl proveden týž pokus s kmenem B₁ bez výměny media a proplachování kultury po adsorpci viru na buňky.

Zjištěné hodnoty byly vynášeny do grafů a interpolací sestrojeny křivky, vyjadřující hladinu volného viru v mediu a viru celkového, tj. vázaného na buňky, i volného, v závislosti na době kultivace při dané teplotě.

VÝSLEDKY

1. Tkáňové pasáže kmene Roakin. Ve všech pěti případech byl maximální infekční titr kultury těsně okolo 10^7 TKID₅₀/0,1 ml (obr. 1) dosažen po 48 hodinách kultivace. V mediu se vysoký infekční titr udržoval podobně jako v plné kultuře (14. a 40. pasáž) do 4. až 5. dne inkubace, kdy docházelo k pozvolnému poklesu. V buňkách byl tento stav obdobný, avšak se zkrácením doby o 24 hod. K poklesu infekčního titru v buněčné frakci, jehož hodnoty nedosahovaly v žádném případě hodnot titru v mediu, docházelo už po dosažení vrcholu po 48 hod. kultivace. Podobný stav bylo možno pozorovat i u hemaglutinačního titru, avšak s tím rozdílem, že v období 24–48 hod. byl vyšší titr hemaglutininu v buňkách než v mediu. Teprve po 72 hod. kultivace poklesl HA titr viru v buňkách pod úroveň pozvolna stoupajícího HA titru v mediu. Maximální HA titr byl 1 : 640.

2. Růst lentogenních kmenů. Při kultivaci lentogenních kmenů B₁ a La Sota ve zkumavkových kulturách byly dosahovány nejvyšší titry mezi 8. a 18. hodinou, a to hodnoty maximálně 10^2 TKID₅₀ v plné kultuře — vzorky „C“ — a $10^{1.77}$ v mediu — vzorky „V“. Vzestup proti výcho-

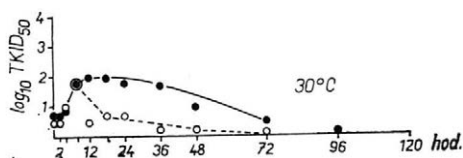


Obr. 1. Křivky hodnot infekčního a hemaglutinačního titru kmene Roakin, sériově pasážovaného na kulturách kuřecích embryonálních buněk v Rouxových lahvích (pasáž 10., 12., 14., 16. a 40).

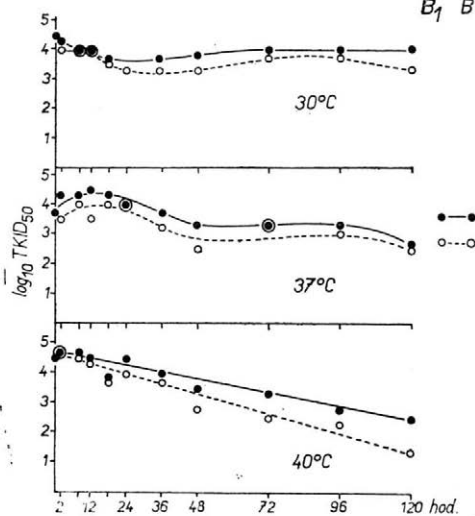
zímu titru viru v kultuře hned po inokulaci ($10^{0.5}$ – $10^{1.68}$ TKID₅₀) byl tedy zcela nepatrný. Vzápětí však docházelo k výraznému poklesu titru, tj. k inaktivaci viru teplem, všeobecně pomalejšímu při 30 °C a v plné kultuře s buňkami a rychlejšímu při 40 °C a v mediu, takže po 36–48 hodinách kultivace klesly hodnoty infekčního titru pod stanovitelné hodnoty ($< 10^{0.5}$ TKID₅₀/0,1 ml). Většinou nebylo možné získané hodnoty ani graficky zpracovat. Na obr. 2 A je křivka hodnot kmene B₁ při 30 °C, na níž je patrný vzestup titru o více než 1 log. jednotku v období do 8–12 hodin kultivace a pokles k nulovým hodnotám do 72 hodin.

Křivky získané po úpravě metodického postupu, při němž nebylo vyměřováno medium a buňky po inokulaci a adsorpci viru nebyly proplachovány, mají charakter spíše inaktivačních křivek než křivek růstových (obr. 2 B), zvláště při teplotě 40 °C. Ani při 30 °C však nebyl zaznamenán významný přírůstek titru proti hodnotám bezprostředně po inokulaci.

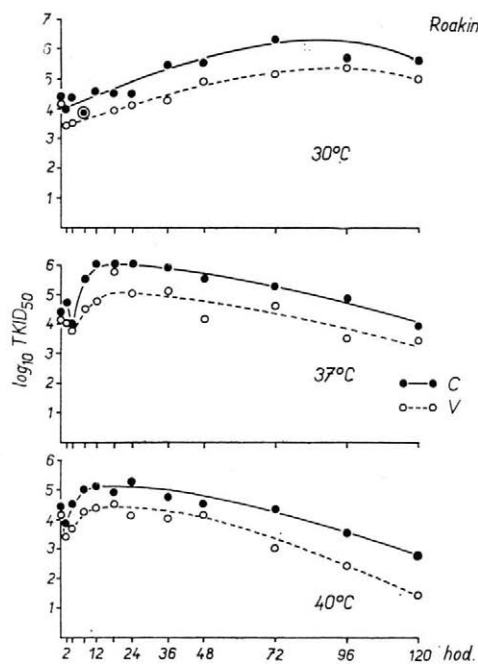
3. Růst mezogenních a velogenních kmenů. Křivky me-



2 A



2 B



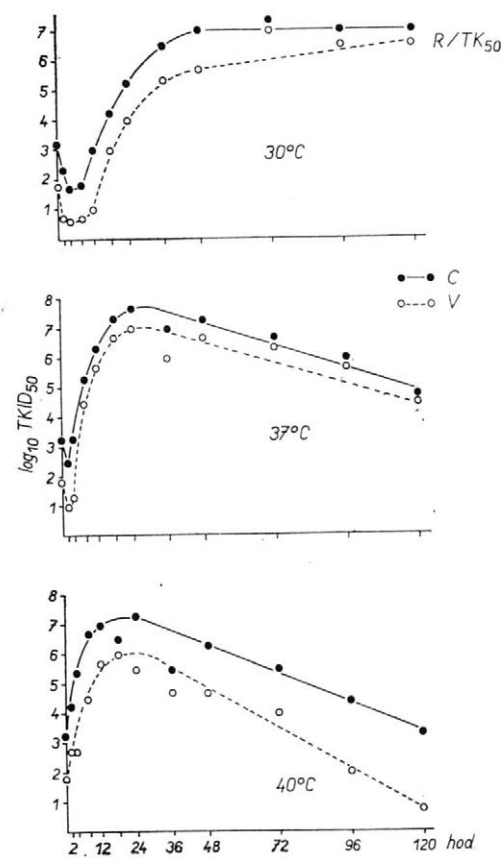
Obr. 3. Křivky hodnot $TKID_{50}/0,1$ ml kmene Roakin ve zkušavkových kulturách KEB při 30, 37 a 40 °C. C = celkový virus v mediu s buňkami V = volný virus v mediu bez buněk

Obr. 2A. Křivka hodnot infekčního titru ($TKID_{50}/0,1$) kmene B1 ve zkušavkových kulturách KEB, propláchnutých po inokulaci a adsorpci viru, při 30 °C.

←

Obr. 2B. Křivky hodnot infekčního titru kmene B1 ve zkušavkových kulturách KEB, očkovaných bez výměny media, při 30, 37 a 40 °C.

C = celkový virus v mediu s buňkami V = volný virus v mediu bez buněk

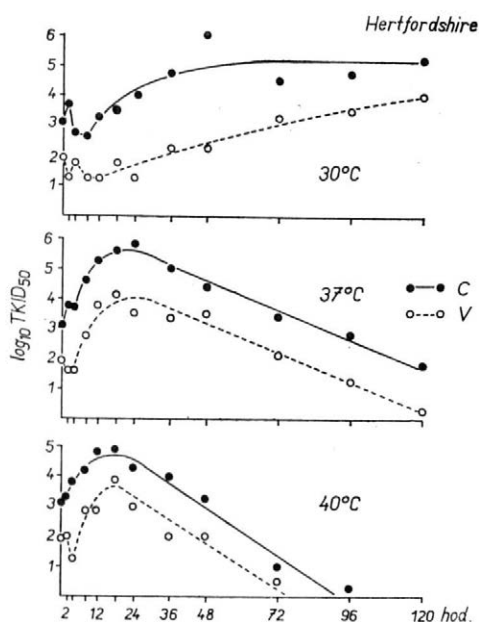


Obr. 4. Křivky hodnot $TKID_{50}/0,1$ ml 50. tkáňové pasáže kmene Roakin ve zkušavkových kulturách KEB při 30, 37 a 40 °C. (Vysvětlivky u obr. 3)

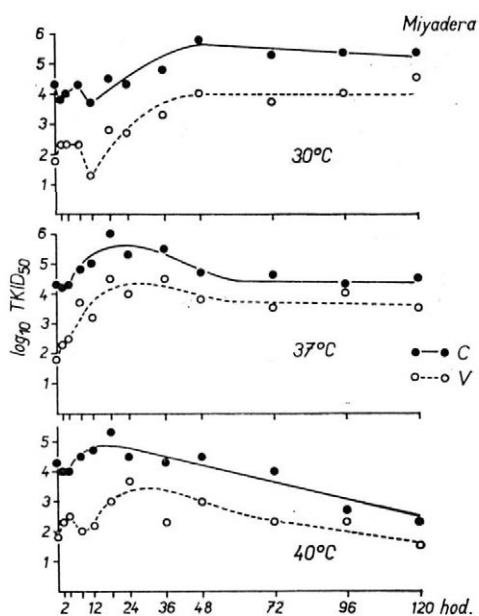
zogenních kmenů vaječného původu, Roakin a Hertfordshire, laboratorního kmene Miyadera i velogenních kmenů 2455/6 a 366/4 (obr. 3, 5, 6, 7, 8,) vykazovaly společné charakteristické vlastnosti.

Doba latence množení viru, charakterizovaná počátečním poklesem titru viru a případným následným ustálením na určité úrovni, byla u jednotlivých kmenů závislá na inkubační teplotě: Při 30 °C dosahovala 8–12 hod., při 37 °C byla 2–4 hod., zatímco při 40 °C jen ve dvou případech dosáhla 4 hod. (366/4 a Miyadera) a v ostatních byla 2 hod. nebo kratší. Hodnota výchozího titru byla překročena při 30 °C po 12–24 hod. kultivace, při 37 °C ve všech případech už po 8 hod. a při 40 °C dokonce ve většině případů už po 2–4 hod.

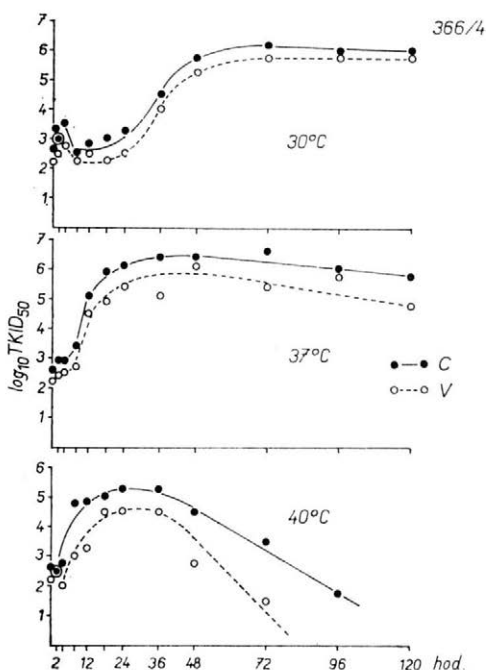
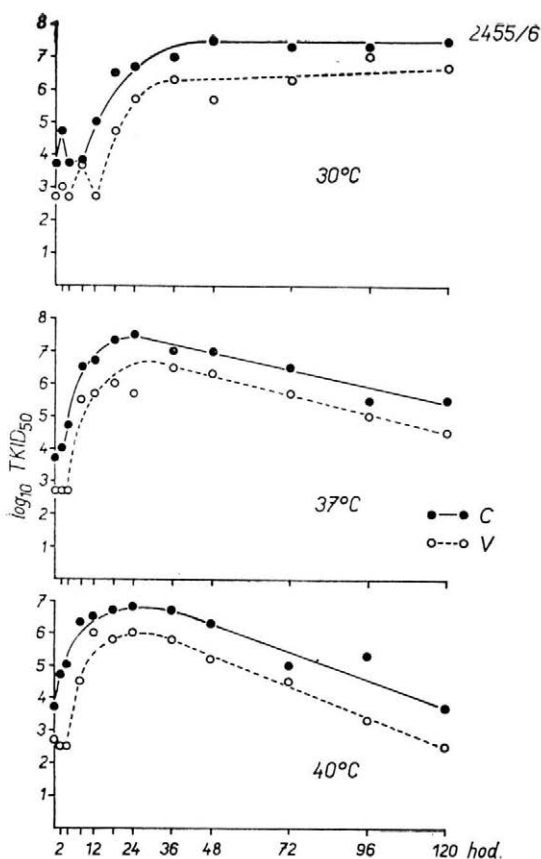
Při 30 °C bylo dosaženo maximálních hodnot titru mezi 48. a 72. hod. kultivace. Vzestup byl velmi pozvolný a titr se udržel zhruba na této úrovni až do konce doby sledování (do 120 hod.). Rozdíl mezi celkovým obsahem viru v kultuře a obsahem volného infekčního viru v mediu byl patrně menší u velogenních kmenů. Při 37 °C se dosahoval maximální titr v období 18 až 24 hod. a po dalších 12–24 hodinách docházelo k postupnému poklesu, který po 120 hodinách přesáhl hodnotu 2 log. stupňů ředění jen u kmene Hertfordshire. Při 40 °C byly zjišťovány nejvyšší titry v době 12–18 hod. Průběh inaktivace byl pak mnohem rychlejší a ve všech případech byl rozdíl nejvyššího titru po 120 hodinách větší než 2 log. jednotky. Nejrychleji byl inaktivován opět kmen Hertfordshire, u něhož titr viru v plné kultuře klesl pod měřitelné hodnoty mezi 72 a 96 hodinami, a kmen 366/4, který nejlépe odolával při teplotě 37 °C.



Obr. 5. Křivky hodnot $TKID_{50}/0,1$ ml kmene Hertfordshire ve zkumavkových kulturách KEB při 30, 37 a 40 °C. (Vysvětlivky u obr. 3)



Obr. 6. Křivky hodnot $TKID_{50}/0,1$ ml kmene Miyadera ve zkumavkových kulturách KEB při 30, 37 a 40 °C. (Vysvětlivky u obr. 3)



Obr. 7. Křivky hodnot $TKID_{50}/0,1$ ml kmene 2455/6 ve zkumavkových kulturách KEB při 30, 37 a 40 °C.

Obr. 8. Křivky hodnot $TKID_{50}/0,1$ ml kmene 366/4 ve zkumavkových kulturách KEB při 30, 37 a 40 °C.

Porovnáme-li tkáňovou linii Roakin — R/TK_{50} — (obr. 4) s originálním kmenem vaječného původu, zjišťujeme, že tkáňová linie dosahovala podstatně vyšších titrů, ačkoliv výchozí titry hned po inokulaci byly při všech použitých teplotách nižší.

I. Průměrný výtěžek viru Newcastlešské nemoci v infekčních dávkách ($TKID_{50}$) na 1 buňku

Kmen	30 °C 48–72 hod.	37 °C 18–24 hod.	40 °C 18–24 hod.
B_1	0,25	0,6	0,5
Roakin	50	25	3,1
R/TK_{50}	500	750	400
Hertfordshire	25	15	2
Miyadera	15	25	5
2455/6	750	750	150
366/4	40	75	5

Výtěžnost viru na 1 buňku kultury kolísala ve velmi širokých hranicích od 0,25 do 750,0 infekčních jednotek (tab. I). Velmi nízká výtěžnost viru byla dosažena u kmenů lentogenních a naopak vysoká u linie R/TK₅₀ a velogenního kmene 2455/6. V tabulce jsou uvedeny u kmene B₁ hodnoty výtěžnosti na 1 buňku v kulturách, které nebyly po inokulaci propláchnuty. Po propláchnutí naočkované kultury jako u kmenů virulentnějších byl výtěžek na 1 buňku při teplotě 30 °C jen 0,00025 infekční jednotky.

Cytopatogenní účinek (CPE) viru na buňky byl sledován u mezogenních a velogenních kmenů mikroskopickým vyšetřením monolayeru při odběru vzorků a u kmene R/TK₅₀ mikroskopicky na sklíčkách, vložených do zkumavky před nasazením kultury KEB. První projevy CPE byly pozorovány při 40 °C po 36 hodinách kultivace a při 37 °C po 48 hod. V obou případech došlo k úplnému rozrušení monolayeru a degeneraci buněk do 72, resp. 96 hod. Při 30 °C byly první náznaky degenerace buněk zjištěny až po 120 hod. V této době však už docházelo k postupnému rozpadu buněčné vrstvy i v kontrolních neinfikovaných kulturách KEB, inkubovaných při 37 a 40 °C.

DISKUSE

Vzestup hemaglutinační aktivity, shodný prakticky s našimi křivkami tvorby hemaglutininu R/TK₅₀, popsali Vrtiak et al. (1960) při kultivaci terénního kmene 18 a kmene B₁ na KEB v Blackových lahvích. Ačkoliv v našem případě infekční titr viru v buňkách v jednotlivých křivkách pasáží R/TK byl vždy nižší než infekční titr viru v mediu bez buněk, nebylo tomu tak s hemaglutinačním titrem, který byl v prvních 48 hodinách vyšší v buňkách. Tento zjev lze vysvětlit tím, že HA titr udává v tomto období kultivace množství nezralých, neinfekčních, incompletních a hemaglutinujících částic viru v buněčné frakci kultury, které se uvolňují do media po kompletizaci ve zralé, infekční částice.

Z třetí části našich pokusů plyne, že buněčná frakce zvyšuje celkové množství infekčního viru v kultuře navzdory konstatování Huygelena a Peetermanse (1963), podle nichž obsah buněk v kultivačním mediu neměl významný vliv na úroveň infekčního titru kmene Komarov. Poměr mezi obsahem infekčního volného viru v kultivačním mediu bez buněk a celkového v mediu s buňkami byl podle našich pozorování závislý jednak na typu virového kmene — velmi malý rozdíl byl zaznamenán u virulentních virů a u R/TK₅₀ při 37 °C — a jednak na kultivační teplotě: Zatímco při 37 °C byl rozdíl prakticky stejný až do konce pozorovací doby, při 30 °C se tento rozdíl poněkud zmenšoval tím, že rychleji stoupal titr volného viru, a naopak při 40 °C se rozdíl zvětšoval následkem rychlejší inaktivace volného viru. Typickým příkladem tohoto úkazu jsou křivky kmene R/TK₅₀ (obr. 4). Ačkoliv rozdíl mezi titry volného a celkového viru nejsou v některých případech signifikantní (méně než 0,5 log. jednotky), pravidelnost výskytu tohoto jevu svědčí pro jeho významnost. Změny tohoto rozdílu lze vysvětlit v prvním případě (teplota 30 °C) tím, že virus, kompletizovaný v buňkách, se pozvolna uvolňuje do media, aniž by docházelo k jeho inaktivaci teplem, a v případě teploty 40 °C tím, že virus v mediu je méně chráněn proti inaktivačním účinkům tepla než virus v buňkách. Při 37 °C je pravděpodobně úbytek viru v mediu následkem tepelné inaktivace částečně kompenzován uvolňováním dalšího viru z buněk, takže dochází k ustálenému stavu a k paralelnímu poklesu titru celkového i volného viru.

Latentní období množení, které je podle našich pokusů nepřímo závislé na inkubační teplotě, udávají různí autoři pro terénní a mezogenní kmeny při 37 °C shodně v rozmezí 3–6 hodin (Gordon et al. 1952, Levine a Sagik 1956, Kohn a Goldwasser 1957, Csikváry, Markovits, Tóth 1961, Gendon a Marchušin 1966, Ždanov et al. 1966) a to při kultivaci v kuřecích zárodcích i v tká-

ňových kulturách různých druhů buněk. Při snížení teploty inkubace na 25 °C se prodloužila doba latence kmene K viru N. n. v kultuře KEB podle Gendona a Marchušina na 3 dny.

Literární údaje mnoha autorů se shodují s našimi výsledky i v době dosažení maximálního titru při inkubační teplotě 37 °C v kulturách KEB: 12 hodin udává Levine a Sagik, 14–16 hodin Zdanov et al., 16 hodin Gordon et al., 20 hodin Csikváry et al., 34 hodin Kohn a Goldwasser na KEB v Petriho miskách a 30–38 hod. Huygelen a Peetermans na buňkách hovězích ledvin. Gordon et al. zaznamenali množení viru v kuřecích zárodcích, probíhající ve dvou fázích, z nichž každá byla charakterizována asi 2hodinovým prudkým růstem, následovaným 4hodinovým obdobím pomalejšího množení. Csikváry et al. pozorovali při kultivaci maďarského terénního kmene ve zkumavkových kulturách KEB tři takové fáze množení, podobně jako French a St. George (1965) při kultivaci neadaptovaného terénního australského kmene na kulturách křeččích ledvinových buněk.

Poměrně rychlý pokles infekčního titru při 37 °C a zvláště při 40 °C vysvětluje okolnost, že po 48 hod. kultivace dochází k destrukci buněčné vrstvy působením viru, buňky se zaokrouhlují, degenerují a uvolňují se od povrchu skla. V tomto období se při daných teplotách neuvolňuje již z buněk další virus v takovém množství, aby byl s to vyvážit úbytek způsobený inaktivací teplem. Thermická inaktivace při 37 °C probíhá zvláště rychle v prvních obdobích působení tepla (Černík, Černíková 1967) a snižuje po 10 dnech titer mezogenních a velogenních kmenů o 3,7 až 5,9 log. jednotek. Pokles asi o 4 log. jednotky pozorovali Csikváry et al. v období mezi 50 a 120 hodinami kultivace. Podle Kohna a Goldwassera byl titer více méně stálý až do 114 hod. inkubace. Mírný pokles po dosažení maxima zaznamenali také Huygelen a Peetermans.

Ačkoliv jsme buňky inokulovali virem v nadbytku — 10 TKID₅₀ na 1 buňku — po propláchnutí buněčného monolayeru jsme zjišťovali stejné výchozí hodnoty jako Kohn a Goldwasser, kteří infikovali KEB na Petriho miskách dávkou 1 ELD₅₀ na 10–15 buněk terénního izraelského kmene HP a adsorbovali virus 2 hod. Průběh růstové křivky kmene HP odpovídá zhruba křivkám, které jsme stanovili pro produkci celkového viru kmene 2455/6 a R/TK₅₀ při 30 °C a 366/4 při 37 °C. Huygelen a Peetermans dosáhli při kultivaci kmene Komarov na buňkách hovězích ledvin nejlepší výsledky při inokulační dávce 0,1–5 infekčních dávek na 1 buňku. Vyšší dávky neměly za následek vyšší výtěžek a nižší dávaly nepravidelné výsledky. Podobně uvádí Rusev (1959), že množení viru bylo závislé na velikosti inokulační dávky — nižší dávka (10^{1,5} TKID₅₀) vyvolala sice později, ale vyšší HA titry než vyšší inokulační dávka (10^{5,5} TKID₅₀). S tímto pozorováním lze porovnat růst kmene B₁, který v našich pokusech při nízkém výchozím titru — po propláchnutí buněčných kultur — vytvořil relativně vyšší titer ve srovnání s výchozím, než při vysokém výchozím titru, kdy nedošlo vůbec k jeho zvýšení během kultivace.

Neúspěch pomnožení lentogenních kmenů na TK byl zvýrazněn tím, že infekční titer jednotlivých vzorků nebyl stanoven v kuřecích zárodcích, ale v tkáňových kulturách, v nichž jsou titry podle naší zkušenosti s kmenem B₁ (Rajtár, Černík, Žuffová 1968) v průměru asi 200krát nižší ve srovnání s titry v kuřecích zárodcích.

Jednotliví autoři udávají za stálých podmínek pro různé kmeny a kultivační prostředí různé hodnoty výtěžnosti. Levine a Sagik dosáhli v suspenzi KEB výtěžnost 18–37 inf. dávek na 1 buňku, Kohn a Goldwasser na KEB v Petriho miskách až 300 inf. částic kmene HP a Csikváry et al. u maďarského kmene ve zkumavkových kulturách KEB až 620 infekčních dávek na 1 buňku. Kolísání výtěžnosti za daných pokusných podmínek bylo ovlivněno typem virového kmene, jeho přizpůsobením tkáňové kultuře a teplotou inkubace. Nejvyšší výtěžnost byla zjištěna u velogenních kmenů a mezogenního kmene, adaptovaného na TK, nejnižší u lentogenních kmenů. Nejvhodnější teplotou bylo 37 °C, v průměru o něco nižší výtěžnost byla dosažena při 30 °C a při 40 °C byla výtěžnost téměř třikrát nižší.

Stanovení růstových křivek přispívá k poznání všeobecných vlastností jednotlivých kmenů viru pseudomoru drůbeže s různou virulencí. Vedle ostat-

ních testů, založených na citlivosti viru vůči různým teplotám, jež byly popsány v předcházejících sděleních (Černík 1966, Černík, Černíková 1967), umožňuje charakterizovat neznámé kmeny viru N. n. a zařadit je alespoň rámcově do některé ze základních skupin jako kmeny lentogenní, mezogenní nebo velogenní.

Došlo dne 24. 1. 1968

Za technickou spolupráci děkujeme paní Marii Pecháčové.

Literatura

1. CSIKVÁRY, L. - MARKOVITS, P. - TÓTH, B.: Propagation of Newcastle disease virus in tissue culture. = „Acta vet. Ac. Sci. Hung.“, 11, 1961 : 375-381.
2. ČERNÍK, K.: Vliv teploty na hemaglutinační aktivitu a infekciozitu některých kmenů NDV. I. Možnost charakteristiky kmenů různé virulence pomocí inaktivace teplem. = „Vet. Med.“ (Praha), 11, 1966 : 321-328.
3. ČERNÍK, K. - ČERNÍKOVÁ, E.: Vliv teploty na hemaglutinační aktivitu a infekciozitu některých kmenů viru Newcastle nemoci. II. Změny hemaglutinability a infekciozity viru během skladování při různých teplotách. = „Vet. Med.“ (Praha), 12, 1967 : 83-92.
4. FRENCH, E. L. - ST. GEORGE, T. D.: The growth and neutralization of Newcastle disease virus in BHK21 tissue cultures. = „Austr. J. exp. Biol. Med. Sci.“, 43, 1965 : 371-380.
5. GENDON, J. - MARCHUŠIN, S.: Virus reproduction in tissue culture at low temperatures. = „Arch. ges. Virusforsch.“, 19, 1966 : 334-341.
6. GORDON, L. E. - BIRKELAND, J. M. - DODD, M. C.: Growth of Newcastle disease virus in the embryonated egg. = „Proc. Soc. exp. Biol. Med.“, 80, 1952 : 205-210.
7. HUYGELEN, C. - PEETERMANS, J.: Studies on the growth of a vaccine strain (Komarov) of Newcastle disease virus in bovine kidney tissue culture and preparation of a vaccine. = „Res. vet. Sci.“, 4, 1963 : 294-302.
8. KOHN, A. - GOLDWASSER, R.: Multiplication of Newcastle disease virus in chick embryo tissue culture. = „Proc. Soc. exp. Biol. Med.“, 96, 1957 : 198-200.
9. LEVINE, S. - SAGIK, B. P.: The interactions of Newcastle disease virus with chick embryo tissue culture cells: Attachment and growth. = „Virology“, 2, 1956 : 57-68.
10. RAJTÁR, V. - ČERNÍK, K. - ŽUFFOVÁ, J.: Titrácia vakcín proti pseudomoru hydiny v kuracích embryách a v tkanivových kultúrach. II. Vakcína B1. = „Veterinárstvi“, 18, 1968 : 114-117.
11. RUSEV, CH.: Kultivovanie virusa Ňukaslskoj bolezni v kulturach kurinych embrionalnych tkaněj. = „Acta virol.“, 5, 1959 : 51-55.
12. VRTIAK, O. J. - POLONY, R. - GDOVINOVA, A.: Kultivácia a cytopatogénny účinok vírusov moru hydiny na tkanivových kultúrach. = „Fol. vet. Cassov.“, 4, 1960 : 137-145.
13. ZDANOV, V. M. - AZADOVA, N. B. - URYVAJEV, L. V.: Topography and dynamics of synthesis of structural proteins of Newcastle disease virus. = „J. Bact.“, 91, 1966 : 1902-1906.

ЧЕРНИК К., ЧЕРНИКОВА Э. (Биовета нац. предпр., Нитра, Чехословакия). Размножение вируса псевдочумы птиц на тканевых культурах при различных температурах. Вет. мед. (Прага), 13 (7) : 393-402, 1968.

Авторы исследовали в течение 120 часов при температуре 30, 37 и 40 °C в однослойной культуре куриных эмбриональных клеток размножение штаммов B1, La Sota, Roakin и его тканевой линии R/TK50, Hertfordshire, Miyadera и эпизоотических штаммов: 2455/6 и 366/4. У лентогенных штаммов не удалось установить значительного повышения инфекционного титра. Выход размноженного вируса оказался очень низким — 0,00025—0,6 инфекционных единиц на одну клетку. У мезогенных и велогенных штаммов с повышающейся температурой сокращалось время латентного периода и также время, необходимое для получения максимального титра из 48—72 часов при температуре 30 °C до 18—24 при 37 °C и 12—18 часов при 40 °C. При температуре 30 °C титр сохраняется на достигнутом уровне до самого конца наблюдения, но при температурах 37 и 40 °C получалась постепенная инаktivация

вируса, более выразительная при высшей температуре. У линии R/TK50 достигли высших титров, чем у первоначального яичного штамма, но инаktivация прошла быстрее. Выход вируса на одну клетку колебался у мезогенных и велогенных штаммов в пределах от 2—750 инфекционных единиц, самый высокий получили у штамма R/TK50 и 2455/6 при температуре 37 °C. Цитопатогенное воздействие проявилось при 40 °C через 36 часов, при 37 °C через 48 и при 30 °C только через 120 часов.

лентогенные, мезогенные и велогенные штаммы; куриные эмбриональные клетки, время латентного периода; инфекционный титр; выход вируса; инаktivация вируса; цитопатогенное действие.

ČERNÍK, K., ČERNÍKOVÁ, E. (Bioveta, Nation. Enterpr., Nitra, Czechoslovakia). *Propagation of the Newcastle Disease Virus on Tissue cultures at Different Temperatures*. Vet. Med. (Praha) 13 (7) : 393—402, 1968.

Propagation of the strains B₁, La Sota, Roakin and of its tissue line R/TK50, Hertfordshire, Miyadera, and of the field strains 2455/6 and 366/4 was investigated for 120 hours in a monolayer culture of chick embryo cells at temperatures of 30, 37, and 40 °C. In lentogenic strains it was not possible to record any significant rising of the infectious titre. The yield of the propagated virus was very low — 0.00025—0.6 infection units per cell. In mesogenic and velogenic strains the length of the latent period and of the time required for the obtaining of a maximum titre shortened with increasing temperature from 48—72 hours at 30 °C to 18—24 hours at 37 °C and to 12—18 hours at 40 °C. At a temperature of 30 °C the titre was maintained at the attained level up to the end of the time of observation, but at temperatures of 37 and 40 °C there occurred a gradual inactivation of the virus, which was more marked at the higher temperature. In the R/TK50 line higher titres were obtained than in the original egg strain, but the process of inactivation was more rapid. The yield of the virus per cell fluctuated in the case of mesogenic and velogenic strains from 2 to 750 infection units, the highest was obtained with the R/TK50 and 2455/6 strains and a temperature of 37 °C. At a temperature of 40 °C the cytopathogenic effect appeared after 36 hours, at 37 °C after 48 hours, and at 30 °C not until after 120 hours.

lentogenic, mesogenic, velogenic strains; chick embryo cells; length of latent period; infections titre; virus yield; inactivation of virus; cytopathogenic effect.

ČERNÍK, K., ČERNÍKOVÁ, E. (Bioveta, VEB, Nitra, Tschechoslowakei). *Die Vermehrung des Virus der Pseudogeflügelpest auf Gewebekulturen bei verschiedenen Temperaturen*. Vet. Med. (Praha) 13 (7) : 393—402, 1968.

Die Vermehrung der Stämme B₁, La Sota, Roakin und dessen Gewebekulturlinie R/TK50, Hertfordshire, Miyadera und der wilden Stämme 2455/6 und 366/4 in den Einschnittgewebekulturen der Hühnerembryozellen wurde bei 30, 37 und 40 °C 120 Stunden lang verfolgt. Bei lentogenen Stämmen ist es nicht gelungen, einen bedeutenden Aufstieg des infektiösen Titers festzustellen. Der Ertrag des vermehrten Virus war sehr niedrig — 0,00025—0,6 der infektiösen Einheiten (IE) auf 1 Zelle bezogen. Bei mesogenen und velogenen Stämmen wurde mit der steigenden Temperatur die Latenzperiode und auch die zur Erreichung des maximalen Titers von 48—72 Stunden bei 30 °C auf 18—24 Stunden bei 37 °C und 12—18 Stunden bei 40 °C nötige Zeit kürzer. Bei 30 °C hält sich der Titer auf dem erreichten Niveau bis zum Ende der Beobachtung, aber bei 37 und 40 °C ist es zur allmählichen Virusinaktivierung gekommen, die bei höherer Temperatur ausgeprägter war. Bei der Linie R/TK50 wurden höhere Titers als bei dem ursprünglichen, auf dem Ei kultivierten Stamm festgestellt, die Inaktivierung verlief aber schneller. Der auf eine Zelle bezogene Ertrag des Virus schwankte bei mesogenen und velogenen Stämmen von 2—750 IE, der höchste war bei den Stämmen R/TK50 und 2455/6 und bei der Temperatur von 37 °C. Die cytopathogene Wirkung erwies sich bei 40 °C nach 36 Stunden, bei 37 °C nach 48 Stunden und bei 30 °C sogar nach 120 Stunden.

lentogene, mesogene, und velogene Stämme; Hühnerembryonalzellen; Latenzperiode; infektiöser Titer; Ertrag des Virus; Inaktivierung des Virus; cytopathogene Wirkung.

Adresa autorů:

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

OPTIMÁLNÍ KONCENTRACE PTAČÍHO TUBERKULINU A DIAGNOSTICKÁ EFEKTIVNOST TUBERKULINACE U SLEPIC

R. Dvořák

ÚSVÚ, Státní kontrola biopreparátů a léčiv, Ivanovice na Hané

DVOŘÁK, R. *Optimální koncentrace ptačího tuberkulinu a diagnostická efektivnost tuberkulinace u slepic.* Vet. Med. (Praha) 13 (7) : 403—408, 1968.

Hodnocení optimální koncentrace aviárního tuberkulinu jsme provedli na slepicích, experimentálně infikovaných *Mycobacterium avium*. Byl testován čsl. obchodní čištěný ptačí tuberkulin, který obsahuje 20 000 TU/ml $\pm$ 4000 TU podle mezinárodního PPD standardu, v koncentracích 2000, 1000, 500 a 250 TU/dos. U tuberkulinů s aktivitou 2000 a 1000 TU/dos byla zjištěna stejná diagnostická spolehlivost a mezi reakcemi nebyl statisticky významný rozdíl. Výsledky na ředění 500 a 250 TU vykazovaly záchytnost až o 20 % nižší. Diagnostická efektivnost tuberkulinace v průběhu pokusu poklesla při aplikaci 2000 TU/dos ze 100% za 160 dní na 65%, u 1000 TU/dos ze 100% na 63,6%, u 500 TU rovněž ze 100% na 47,1% a u koncentrace 250 TU z původní záchytnosti 95,5% na 48,4%.

tuberkulin ptačí; aktivita; diagnostická spolehlivost.

Při vyšetřování drůbeže na tuberkulózu zůstává tuberkulinace stále nej-používanější metodou. Otázka optimální koncentrace tuberkulinu není však dosud dostatečně vyřešena. Často se považuje za nejvhodnější aktivita 25 000 TU/ml. U většiny autorů však nenacházíme zdůvodnění doporučené koncentrace. Tuberkuliny používané v zahraničí mají podle údajů v návodech k použití různou aktivitu, např. v Anglii 25 000 TU, v Polsku 50 000, nověji 0,8 mg tuberkuloproteinu v 1 ml, v NDR 75 000 TU/ml. Čsl. čištěný ptačí tuberkulin (Bioveta v Ivanovicích n. H.) t. č. obsahuje 20 000 $\pm$ 4000 TU/ml.

Práce zabývající se upotřebením ředěných tuberkulinů jsou ojedinělé. Schneider (1956) dosáhl nejlepších výsledků s neředěným nebo 50 % vetus tuberkulinem. Švrček, Vrtiak, Komárek (1965) uvádějí, že diagnostická spolehlivost tuberkulinu s obsahem 25 000 a 50 000 TU je celkem stejná. Aktivitu tuberkulinu stanovili gravimetricky (0,00002 mg tuberkuloproteinu = 1 TU). Rossi (1965) zjistil u experimentálně infikovaných kohoutů PPD tuberkulinem v dávkách 200, 1000 a 5000 TU téměř stejné výsledky a vyvozuje, že je možno dosáhnout spolehlivých diagnostických výsledků i nižšími koncentracemi TU (1250 a 625 TU/dos).

V našich pokusech jsme se zabývali diagnostickou spolehlivostí různých ředění a sledováním, do jaké míry se aktivita tuberkulinu podílí na nízké diagnostické efektivnosti tuberkulinového testu u slepic.

MATERIÁL A METODIKA

Tuberkulin. K pokusům jsme používali čsl. komerční tuberkulin čištěný ptačí, titrovaný podle standardního PPD ptačího tuberkulinu z ústřední veterinární laboratoře, Weybridge, Anglie (TP 175, Bioveta v Ivanovicích

n. H.). K pokusům byl připraven v koncentracích 2000, 1000, 500 a 250 TU/0,1 ml. K ředění byl použit pufrovaný roztok s 10 % glycerinu a 0,5 % fenolu.

Pokusná zvířata a infekce. Do pokusu byly zařazeny slepice, bílé leghorn, staré 1–2 roky, pocházející ze zdravého prostředí a nereagující na tuberkulin. K umělé infekci jsme použili *Mycobacterium avium*, kmen AI 96, pěstovaný na Pavlovského půdě. Infekce byla provedena suspensí 2 mg bakteriální hmoty šestitýdenní kultury ve fyziologickém roztoku *i. m.* do prsní svaloviny.

Provedení a posouzení tuberkulinace. Tuberkuliny byly aplikovány *i. d.* do lalůčku při jeho distálním okraji v dávce 0,1 ml. Reakce byly hodnoceny za 24 a 48 hodin. Zduření jsme měřili kutimetrem na volně visícím lalůčku v jeho největším rozšíření a odpočítali od síly lalůčku před tuberkulinací. Současně jsme posuzovali reakci pomocí křížků (+ až + + + +). Stejným způsobem jsme zjišťovali případné zduření kontrolního lalůčku.

Uspořádání pokusu. Pokus byl proveden na 90 slepicích, rozdělených do 4 skupin. První skupina (24 slepic) byla vyšetřována tuberkulinem s aktivitou 2000 TU/0,1 ml, druhá skupina (22 slepic) 1000 TU/dos, třetí (24 slepic) 500 TU/dos. Do čtvrté skupiny bylo zařazeno 20 slepic a použito 250 TU/dos. Tuberkulinace byly provedeny za 38, 72, 126, 170 a 198 dní po infekci.

Statistické hodnocení r. č. bylo provedeno obecným Studentovým t-testem.

VÝSLEDKY

Diagnostická spolehlivost použitých ředění je uvedena v tabulce I.

Při hodnocení reakcí za 24 hodin jsme zjistili přibližně stejnou diagnostickou spolehlivost u tuberkulinů s aktivitou 2000 a 1000 TU/dos u všech tuberkulinací po infekci. K sobě se přibližují i výsledky při použití ředění 500 a 250 TU/dos. Na koncentrace 500 a 250 TU je záchytnost všeobecně o 10 až 20 % nižší než aktivnější tuberkuliny. Při prodlužování časového intervalu mezi infekcí a tuberkulinací dochází u všech použitých koncentrací ke snižování diagnostické efektivity. U tuberkulinu s aktivitou 2000 TU/dos ze 100 % záchytnosti 38. den po infekci klesá za dalších 160 dní na 75 % a u 1000 TU/dos rovněž za 100 % na 81,8 %. U 500 TU/dos, kde byla už při I. tuberkulinaci po infekci záchytnost jen 87,5 % na 58,9 % a u koncentrace 250 TU z původních 86,4 % na 53,8 % pozitivně a dubiózně reagujících slepic.

Při posuzování za 48 hodin zjišťujeme přibližně stejnou diagnostickou spolehlivost na všechna použitá ředění ještě při III. tuberkulinaci, tj. 126 dní po infekci, bereme-li v úvahu i dubiózní reakce, jejichž počet se u koncentrací 500 a 250 TU zvyšuje. Avšak jen za 38 dní po infekci je 100 % zjištění infikovaných slepic na první tři koncentrace. Diagnostická efektivity se postupně snižuje, až při V. tuberkulinaci klesla u 2000 a 1000 TU na 63 až 65 %, u 500 a 250 TU na 47–48 %.

Průměrná reakční čísla naměřená za 24 a 48 hodin (tab. II) jsou v přímé závislosti na koncentraci tuberkulinu. Maximální zduření se projevuje při tuberkulinaci 72 dní po infekci, a to u všech ředění. Zatímco při posuzování za 24 hodin zjišťujeme při III., IV. a V. tuberkulinaci nepravi-

I. Diagnostická spolehlivost ředěných ptačích tuberkulinů v různých časových odstupech po i. m. infekci *M. avium*

Tuberkulinace po infekci <i>M. avium</i> za	Posouzení za	Použité koncentrace tuberkulinu v TU/dos											
		2000			1000			500			250		
		% reakcí											
		pos.	dub.	neg.	pos.	dub.	neg.	pos.	dub.	neg.	pos.	dub.	neg.
38 dní	24 hodin	100	—	—	95	5	—	79,2	8,3	12,5	81,9	4,5	13,6
72 dní		100	—	—	100	—	—	87	8,7	4,3	90,6	4,7	4,7
126 dní		82,8	4,2	13	88,3	—	11,7	76,3	4,7	19	62,6	18,7	18,7
170 dní		95	—	5	84,2	7,9	7,9	63,2	10,5	26,3	76,9	7,7	15,4
198 dní		70	5	25	72,7	9,1	18,2	47,2	11,7	41,1	53,8	—	46,2
38 dní	48 hodin	95,8	4,2	—	100	—	—	95,9	4,1	—	95,5	—	4,5
72 dní		95,8	—	4,2	95	—	5	87	8,7	4,3	81	4,7	14,3
126 dní		82,8	—	17,2	88,3	—	11,8	76,3	14,3	9,4	68,8	12,5	18,7
170 dní		85,5	5	10	76,3	7,9	15,8	47,5	21	31,5	69,2	—	30,8
198 dní		65	5	30	63,6	—	36,4	47,1	—	52,9	48,4	11,4	46,2

II. Průměrná reakční čísla na použité koncentrace ptačího tuberkulinu v mm

Koncentrace tuberkulinu v TU/dos	Posouzení tuberkulinace									
	I.	II.	III.	IV.	V.	I.	II.	III.	IV.	V.
	za 24 hod.					za 48 hod.				
2000	3,5	5,2	3,5	5,3	2,7	4,9	6,3	5,1	5,6	3,1
1000	2,5	3,8	3,3	3,8	2,8	4,3	5,0	5,0	4,5	2,4
500	2,6	3,5	2,5	2,3	2,3	4,3	4,7	4,1	3,5	2,5
250	2,2	3,4	2,1	2,9	1,5	3,8	3,9	2,8	3,7	1,4

delnosti ve výši reakce, při posuzování za 48 hod. je celkem pravidelné snižování průměrných r. č. na jednotlivé koncentrace. Za 48 hodin jsou reakce vyšší než za 24 hodin.

Rozdíl mezi reakcemi je statisticky významný při I. tuberkulinaci mezi 2000 a 250 TU ($t = 2, 291$; s. v. = 44; $p < 0,05$), při II. tuberkulinaci 2000 a 500 TU ($t = 2, 614$; s. v. = 44; $p < 0,02$) a 2000 a 250 TU ($t = 3, 593$; s. v. = 42; $p < 0,01$), při III. tuberkulinaci 2000 a 250 TU ($t = 2, 710$; s. v. = 36; $p < 0,02$).

Statisticky významný rozdíl mezi výsledky po 2000 a 1000 TU nebyl zjištěn při žádné tuberkulinaci.

DISKUSE

Především experimentální práce Rossiho (1965) dala podnět ke studiu možnosti vyrábět a používat k alergické diagnostice u slepic méně koncentrovaný tuberkulin. Tomu předcházelo zavedení biologické standardizace jednotlivých op. čísel za použití ptačího tuberkulinu PPD z Ústřední veterinární laboratoře ve Weybridge (Anglie), který byl ustanoven jako mezinárodní standard v roce 1954 (WHO expert committee on biological standardization 1964). Titrace podle tohoto standardu je nezbytná ke srovnání údajů o nejvhodnější koncentraci ptačího tuberkulinu.

Výsledky zjištěné v pokusech odpovídají nejvíce poznatkům Schneidera (1956), který nedosáhl ředěným tuberkulinem spolehlivých diagnostických závěrů. Výsledky, které získal Rossi (1965) nižšími dávkami TU, můžeme potvrdit vyšetřením 38 dní po *i. m.* infekci. Při dalších tuberkulinacích se však diagnostická spolehlivost na nízké koncentrace (500 a 250 TU) snížila, což se projevilo zvětšením počtu negativních nebo alespoň dubiozních reagentů.

Ze sledovaných koncentrací vykazuje největší diagnostickou spolehlivost tuberkulin s obsahem 2000 a 1000 TU/dos. Více ředěné tuberkuliny nelze doporučit, poněvadž ani při vyšetření za 38 a 72 dní po infekci, kdy byla 2000 a 1000 TU/dos prokázána 100% spolehlivost, nebyly jimi odhaleny všechny uměle infikované slepice.

Diagnostická efektivnost tuberkulinace se v průběhu našich pokusů snižovala. Tato skutečnost se projevila u všech použitých ředění a u nižších koncentrací byla výraznější. Z toho vyplývá, že se také aktivita tuberkulinu podílí vedle řady dalších faktorů na efektivnosti alergického vyšetření tuberkulózy u slepic.

Došlo dne 20. 8. 1967

Literatura

1. ROSSI, L.: Studie alergie u drůbeže experimentálně intramuskulárně infikované *M. avium* po aviárním tuberkuloproteinu. = „Veterinární medicína“ 10, 1965 : 201-210.
2. SCHNEIDER, E.: Vergleichende Untersuchungen über die Wirksamkeit verdünnter Geflügeltuberkuline. = „Vet. med. dis. München“, 1956, 35 s.
3. ŠVRČEK, Š. - VRTIAK, J. - KOMÁREK, P.: K otázce diagnostické efektivnosti československého aviárního PPD tuberkulinu. = Rukopis, 1965.
4. WHO expert committee on biological standardization seventeenth report, Geneva. = „WHO“ 1964 : 54.

ДВОРЖАК Р. (ЦУВИ, Государственный контроль биопрепаратов и лекарств, Ивановице на Гане, Чехословакия). Оптимальная концентрация птичьего туберкулина и диагностическая эффективность туберкулинизации у кур. Вет. мед. (Прага) 13 (7) : 403-408, 1968.

Оценку оптимальной концентрации птичьего туберкулина произвели на курах, экспериментально инфицированных *Mycobacterium avium*. Проверяли коммерческий очищенный туберкулин чехословацкого производства, в состав которого входит 20.000 ТЕ/мл $\pm$ 4.000 ТЕ на основании международного ППД стандарта, в концентрациях 2.000, 1.000, 500 и 250 ТЕ в дозе. У туберкулинов с активностью 2.000 и 1.000 ТЕ в дозе установили одинаковую диагностическую надежность и между реакциями не определили никакого значительного различия. Разбавление 500 и 250 ТЕ показало результаты обнаружения даже на 20 % ниже. Диагностическая эффективность туберкулинизации понизилась в процессе опыта при аппликации 2.000 ТЕ в дозе из 100 % в течение 160 дней до 65 %, у 1.000 ТЕ до 63,6 %, у 500 ТЕ до 47,1 % и при концентрации 250 ТЕ из первоначальных 95,5 % до 48,4 %.

птичий туберкулин; активность; диагностическая надежность.

DVOŘÁK, R. (ÚSVÚ, State Control of Biopreparations and Drugs, Ivanovice na Hané, Czechoslovakia). Optimum Concentration of Avian Tuberculin and the Diagnostic Effectiveness of Tuberculinization in Hens. Vet. Med. (Praha) 13 (7) : 403-408, 1968.

An evaluation of the optimum concentration of avian tuberculin was carried out in hens that had been infected experimentally with *Mycobacterium avium*. Tested was the Czechoslovak commercial purified avian tuberculin containing 20 000 TU/ml $\pm$ 4000 TU according to the international PPD standard and applied in concentrations of 2000, 1000, 500 and 250 TU/dos. For tuberculins with an activity of 2000 and 1000 TU/dos an identical diagnostic reliability was found and between the reactions there was no statistically significant difference. The results obtained with a dilution of 500 and 250 TU showed an effectiveness lower by up to 20 per cent. In the case of an application of 2000 TU/dos the diagnostic effectiveness of tuberculinization decreased in the course of the experiment from 100 per cent in 160 days to 65 per cent, in the case of an application of 1000 TU/dos from 100 per cent to 63.6 per cent, in the case of 500 TU also from 100 to 47.1 per cent, and in the case of a concentration of 250 TU from the original 95.5 to 48.4 per cent.

avian tuberculin; activity; diagnostic reliability.

DVOŘÁK, R. (Die Staatskontrolle der Biopräparate und Arzneimittel, Ivanovice na Hané, Tschechoslowakei) *Die optimale Konzentration des aviären Tuberkulins und die diagnostische Effektivität der Tuberkulinisierung bei Hennen*. Vet. Med. (Praha) 13 (7) : 403—408, 1968.

Die Bewertung der optimalen Konzentration des aviären Tuberkulins wurde auf mit *Mycobacterium avium* experimentell infizierten Hennen durchgeführt. Es wurde das tschechoslowakische, gereinigte aviäre Tuberkulin getestet, das 20.000 TE/ml $\pm$ $\pm$ 4.000 TE nach internationalem PPD-Standard in Konzentrationen 2.000, 1.000, 500 und 250 TE in einer Dose enthält. Bei Tuberkulinen mit Aktivität von 2.000 und 1.000 TE/Dose wurde dieselbe diagnostische Verlässlichkeit festgestellt und zwischen Reaktionen zeigte sich kein statistisch signifikanter Unterschied. Die Resultate bei Verdünnung auf 500 und 250 TE wiesen einen um sogar 20% niedrigeren Befund aus. Die diagnostische Effektivität der Tuberkulinisierung sank im Verlaufe des Versuchs in 160 Tagen bei Applikation von 2.000 TE in einer Dose von 100% auf 65%, bei 1.000 TE/Dose von 100% auf 63,6%, bei 500 TE ebenfalls von 100% auf 47,1% und bei der Konzentration von 250 TE von ursprünglichen 95,5% auf 48,4%. das aviäre Tuberkulin; Aktivität; diagnostische Verlässlichkeit.

Adresa autora:

MVDr. Rastislav Dvořák, ÚSVÚ, Státní kontrola biopreparátů a léčiv,
Ivanovice na Hané
Ředitel: Dr. Z. Malhocký

ZHODNOCENÍ SÉROLOGICKÝCH VYŠETŘENÍ NA BEDSONIÓZU PLEMENNÝCH BÝKŮ A VZTAH K PLODNOSTI

J. Toman

Ústřední státní veterinární ústav, Pardubice

TOMAN, J. *Zhodnocení sérologických vyšetření na bedsoniόzu plemenných býků a vztah k plodnosti*. Vet. Med. (Praha) 13 (7): 409—414, 1968.

V této práci bylo provedeno zhodnocení sérologických nálezů u 284 plemenných býků a zhodnocení vztah hladiny titrů k plodnosti. Ve skupině 64 býků s pozitivním titrem (22,6 %) nebylo podstatných rozdílů při porovnání s plodností po I. inseminaci celoroční, ani v měsíci vyšetření ve skupině býků bez titru. Určité rozdíly byly pouze ve skupině zvířat s titrem 1:16 a výše, ale protože šlo o skupinu pouze 49 zvířat, nelze z uvedených vyšetření vyvozovat závěry. Protože v současné době se touto otázkou nikdo systematicky nezabývá, je třeba na tuto okolnost upozornit a věnovat jí náležitou pozornost, stejně tak jako otázkám mimogenitální přítomnosti tohoto infekčního agens. enzootická neplodnost skotu; bedsonie; protilátky v krevním séru.

Od roku 1958 byla v různých lokalitách ČSSR pozorována enzootická neplodnost skotu, která někdy působila vážné národohospodářské ztráty. Dosud nebylo při těchto procesech možno stanovit infekční agens a diagnostika se opírala převážně o klinické nálezy u plemeníků i plemenic. V roce 1965 Boháč, Věžník a kol. určili bedsonie jakožto jednoho z původců enzootické neplodnosti skotu ČSSR. V souboru diagnostických metod uvádějí k průkazu bedsoniόzy mezi předními sérologické vyšetření použitím metody vazby komplexů. Tato práce má přispět k objasnění významu použití sérologických vyšetření v praxi.

Enzootická neplodnost se v tomto století stala závažnou problematikou v celém světě. Již Williams v roce 1923 poukázal na úlohu samců jako šířitelů genitálních infekcí. I pohlavní orgány klinicky zdravých zvířat mohou přechovávat virus, který se může kdykoliv aktivovat. U jalovic i krav se projevuje vaginitida a těžká cervicitida.

Jones a Little (1927) pozorovali granulární *vaginitis* ze které izolovali grampozitivní kokoidní pleiomorfni útvary suspektní na tělíska bedsonií nebo PPLO.

Enzootickou neplodností virové etiologie se dále zabývali Webster (1932), van Rensburg (1953), Henning (1949), Hudson (1949), Bouters a spol. (1961), Conradi a spol. (1962), Florent a spol. (1962) a celá řada dalších.

Jako infekční agens je udáván nejčastěji virus IBR—IPV, PPLO, Miyagawanelly, mykoplasmata a enteroviry.

Kaaden a Lieberman 1966 sledovali výskyt protilátek proti Miyagawanellám u skotu NDR. Z 1014 zvířat reagovalo pozitivně 24 %.

Afshar (1965) popisuje aborty skotu vyvolané Miyagawanellami, York a Baker (1956) infekce telat.

Věžník, Boháč a spol. v roce 1965 označili bedsonie jako jednoho z původců enzootické neplodnosti skotu v ČSSR.

MATERIÁL A METODY

K sérologickému vyšetření RVK na bedsoniózu bylo získáno jednorázově v roce 1966–1967 krevní sérum od 284 plemenných býků z 12 PS Východočeského kraje a z krajských karantén. Sérologické vyšetření bylo provedeno Dr. Trunkátem z OSD Český Brod použitím chladničkové metody vazby komplementů, s antigenem vyrobeným Biovetou n. p., Ivanovice na Hané, podle Dekkina. Získané výsledky vyšetření byly zhodnoceny podle výšky titrů jednotlivých býků a celé PS. Od býků, kteří působili v plemenitbě, bylo provedeno porovnání výšky titrů ve vztahu k plodnosti po I. inseminaci za měsíc, kdy vyšetření bylo provedeno a ve vztahu k celkové jejich plodnosti v roce.

VLASTNÍ POZOROVÁNÍ

Účelem této práce bylo především zhodnotit počet plemenných býků s přítomností protilátek podle jednotlivých PS, výši titrů, vyhodnotit vztah protilátek v krevním séru k plodnosti po I. inseminaci, a to jak v měsíci vyšetření, tak plodnosti celoroční a vyhodnotit rozdíl plodnosti býků s titrem a bez titru. K uvedeným výsledkům zaujmout stanovisko použitelnosti sérologického vyšetření k diagnostice enzootické neplodnosti skotu.

Tabulka I. ukazuje celkový přehled o provedení vyšetření, Z tohoto pře-

I. Sérologické vyšetření krve na bedsoniózu u plemenných býků na PS Východočeského kraje za rok 1966

OSD Český Brod								
PS	všech býků	negativní ks a %	celkem sérol. reagují	1 : 4	1 : 8	1 : 16	1 : 32	1 : 64
Brná	27	21(77,7 %)	6(22,3 %)	1	2	1	–	2
Kostelec n. Orl.	24	21(87,5 %)	3(12,5 %)	1	1	–	–	1
Malejov	28	15(53,5 %)	13(46,5 %)	6	6	1	–	–
Nechanice	27	21(77,7 %)	6(22,3 %)	5	1	–	–	–
Nový Dvůr	22	19(86,3 %)	3(13,7 %)	2	–	1	–	–
Osík	17	15(88,2 %)	2(11,8 %)	–	1	1	–	–
Police n. M.	17	15(88,2 %)	2(11,8 %)	2	–	–	–	–
Trutnov	16	11(68,6 %)	5(31,4 %)	3	1	1	–	–
Ústí n. O.	28	24(85,6 %)	4(14,4 %)	3	1	–	–	–
Turnov	22	9(40,9 %)	13(59,1 %)	6	4	3	–	–
Židovice	25	21(84,0 %)	4(16,0 %)	2	1	–	1	–
Pomezí	31	28(90,3 %)	3 (9,7 %)	2	1	–	–	–
Celkem vyšetřeno býků:	284 ks	220 ks 77,4 %	64 ks 22,6 %	33 52%	19 29,9 %	8 12,5 %	1 1,5 %	3 4,6 %

hledu je patrné, že z 284 plemenných býků bylo 220 (77,4 %) bez titru a 64 plemenných býků (22,6 %) s titrem. Nejvyšší počet býků s titrem měla PS Turnov (59,1 %), dále Malejov (46,5 %), nejnižší PS Pomezí (9,7 %).

Z tabulky I je zřejmé, že největší počet zvířat mělo titr 1 : 4, a to 33 býků, 1 : 8 19 býků, 1 : 16 8 býků, 1 : 32 1 býk a 1 : 64 3 býci.

Z uvedených vyšetření se ukázalo, že na všech PS Východočeského kraje jsou býci s přítomností protilátek v krevním séru proti bedsoniím.

Tabulka II. ukazuje vyhodnocení plodnosti po I. inseminaci u býků séronegativních a séropozitivních, za celý rok a za příslušný měsíc, kdy vyšetření bylo provedeno.

II. Vyhodnocení plodnosti býků

	Býků celkem:	Plodnost nad 60 %	Plodnost 55,1 – 60 %	Plodnost 50 – 55 %	Celkem plodnost nad 50 %	%	Plodnost 45,1 – 49,9 %	Plodnost 40 – 45 %	Plodnost pod 40 %	Celkem plodnost pod 50 %	%
Sérologicky negativní Ø plodnosti roční 1966	204	44	69	60	173	84,8 %	21	8	2	31	15,2 %
Sérologicky pozitivní Ø plodnosti roční 1966	149	15	34	70	119	79,9 %	18	10	3	30	20,1 %
Sérologicky pozitivní Ø plodnosti v měsíci vyšetření (1966)	119	35	24	32	91	76,5 %	12	7	9	28	23,5 %

Ve skupině 204 vyhodnocených býků bez titru mělo plodnost nad 50 % 173 býků (tj. 84,8 %) a 31 býků (15,2 %) vykázalo sníženou plodnost pod 50 % za období celého roku.

Ve skupině býků sérologicky pozitivních bylo vyhodnoceno 149 býků a z nich má plodnost nad 50 % 119 plemeníků (79,9 %) a 30 býků má sníženou plodnost pod 50 % (tj. 20,1 %) plemeníků z této skupiny. Z uvedeného přehledu je patrné, že ve skupině býků se zjištěnou hladinou protilátek je plodnost nižší než 50 % u 4,9 % býků více, než u býků bez titru. Z tohoto pozorování lze soudit, že není podstatných rozdílů v celoroční plodnosti býků bez titru a s pozitivním titrem.

Při pozorování plodnosti býků za měsíc, kdy vyšetření bylo provedeno, mělo sníženou plodnost pod 50 % 23,5 % býků, což je o 8,3 % více, než ve skupině býků sérologicky negativních. Z toho je patrné, že zde je rozdíl výraznější, ale ne zcela signifikantní.

V další části práce bylo provedeno porovnání vztahu výšky titru k plodnosti. Výsledky jsou shrnuty v přehledu na tabulce III. Při porovnání s plodností v měsíci vyšetření je patrné, že býci s titrem 1 : 4 a 1 : 8 měli lepší

III. Vyhodnocení sérologických titrů na bedsoniózu se vztahem k plodnosti býků

Plodnost v měsíci vyšetření:											
Počet vyhodnocených býků:	Titř:	Plodnost nad 60 %	Plodnost 55,1 — 60 %	Plodnost 50—55 %	Celkem ks nad 50 %	%	Plodnost 45,1—50 %	Plodnost 40—45 %	Plodnost pod 40 %	Celkem ks pod 50 %	%
35 (100 %)	1 : 4	13	8	9	30	85,5 %	2	1	2	5	14,5 %
35 (100 %)	1 : 8	12	7	10	29	82,2 %	—	3	3	6	17,8 %
35 (100 %)	1 : 16	7	7	10	24	68,5 %	6	2	3	11	31,5 %
9 (100 %)	1 : 32	2	2	2	6	60,0 %	2	—	1	3	40,0 %
5 (100 %)	1 : 64	1	—	1	2	33,0 %	2	1	—	3	67,0 %
119 (100 %)		35	24	32	91	76,5 %	12	7	9	28	23,5 %
Plodnost v roce vyšetření:											
Počet vyhodnocených býků:	Titř:	Plodnost nad 60 %	Plodnost 55,1—60 %	Plodnost 50—55 %	Celkem ks nad 50 %	%	Plodnost 45,1—50 %	Plodnost 40—45 %	Plodnost pod 40 %	Celkem ks pod 50 %	%
42 (100 %)	1 : 4	4	14	18	36	85,8 %	5	1	—	6	14,2 %
44 (100 %)	1 : 8	3	12	17	32	72,6 %	5	6	1	12	27,4 %
42 (100 %)	1 : 16	6	6	23	35	83,3 %	5	2	1	7	16,7 %
16 (100 %)	1 : 32	2	2	8	12	74,9 %	2	1	1	4	25,1 %
5 (100 %)	1 : 64	—	—	4	4	79,9 %	1	—	—	1	20,1 %
149 (100 %)		15	34	70	119	79,8 %	18	10	3	30	20,2 %

plodnost než býci bez titru. Býci s titrem 1:16 měli však o 11,4 % plodnost nižší než býci bez titru a býci s titrem 1:32 dokonce o 22,2 %. Ve skupině 5 býků s titrem 1:64 v 67 % byla plodnost snížena pod 50 %.

DISKUSE

Výsledky shrnuté v této práci vykazaly, že ve Východočeském kraji se v současné době nachází poměrně vysoké procento býků s přítomností protilátek proti bedsoniím v krevním séru, a to 22,6 %. Porovnáme-li toto číslo se sledováním Kaaden a Liebermana v NDR (1966), kde zjistili v souboru 1014 vyšetřených zvířat 24 % pozitivních nálezů, je zamoření u nás přibližně stejné.

Dosavadní výsledky vyšetření ukázaly, že v současné době z jednorázových vyšetření sérologických nelze odvodit samostatně žádné významnější vztahy k plodnosti, protože i ve skupině býků s vysokými titry šlo o malý soubor zvířat, takže výsledek není zcela objektivní a bude nutno provést další pozorování na velkém počtu zvířat.

Lieberman a Kaaden (1966) zjistili po onemocnění telat výrazné změny v hladině titru, který v době akutního onemocnění byl negativní, dosáhl maximálních výšek v 8 týdnech a v dalších 8 týdnech došlo k výraznému poklesu. Titr je dočasný a pomíjející, v našich pozorováních jsou časté recidivy, takže není možné činit porovnání s nálezy při BAB, kdy titr trvá po celý život zvířete. Vzhledem k celkovému charakteru onemocnění, které postihuje i respiratorní aparát, nacházíme pochopitelně pozitivní sérologické nálezy i při lokalizaci mimo genitální trakt, kdy plodnost je pochopitelně normální. Sérologické vyšetření v současném stadiu zůstává cenným orientačním vyšetřením vedle vyšetření kultivačního, ale klinické vyšetření je při současném stavu základem pro další diagnostiku. Na podkladě klinických projevů onemocnění je nutné volit sérologická vyšetření opakovaně. Sérologická vyšetření sehrají větší roli až při tlumení nákazy jako takové, než v samé diagnostice enzootické neplodnosti skotu.

Došlo dne 3. 1. 1968

Literatura

1. AFSHAR, A.: Viral Abortion and Infertility in Cattle. = „Vet. Bull.“ 33, 1963: 4, 165-168
2. BOUTERS, R.: Vandeplasche M., Florent A., Devos A.: De ulcereuse Balanoposthitis bij fokstieren. = „Vlaams Diergeneesk.“ 24, 1960: 2, 171-180.
3. CONRADI H., SCHARDTNER H., WOHANKA K.: Das klinische Bild des Bläschenausschlages (Exanthema coitale vesiculosum) beim Bullen. = „Zuchthyg.“ 6, 1962: 154-161.
4. FLORENT A., BOUTERS R., VANDEPLASSCHE M.: Invloed van virusinfecties op de vruchtbaarheid van runderen. = „Vlaams. Diergeneesk. Tijdschr.“ 31, 1962: 71-73.
5. HENNING M. W.: Infectious or epizootic infertility of cattle. Infectious bovine cervico-vaginitis and epididymitis. = „J.S.Afr. Vet. Med. Ass.“ 20, 1949: 9-15.
6. HUDSON J. R.: A specific venereal disease of cattle characterized by epididymitis in bulls and vaginitis in cows and heifers. Proc 14th Internat. Vet. Congr. London. 2, 1949: 487.
7. JONES F. S., LITTLE R. B.: An infectious granular vaginitis of cows. = „J. Exp. Med.“ 45, 1927: 519-529.
8. KAADEN O. R., LIEBERMANN H.: Vorkommen und Bedeutung von Miyagawana-Antikörpern bei Rindern in Norden der DDR. = „Arch. f. Exp. Vet. med.“ 20, 1966: 5, 921-926.

9. RENSBURG S. W. J. van: Bovine sterility causes by infectious disease in South Africa. = „Brit. Vet. J.“ 109, 1953: 226-233.
10. VĚŽNÍK Z., BOHÁČ J.: Výzkum diagnostiky, etiologie, pathogenese, tlumení a prevence tak zvané enzootické neplodnosti skotu. Výzk. úkol R III-2/1, VÚVL Brno, 1966.
11. WEBSTER W. M.: Bovine sterility in New Zeland. = „Austr. Vet. J.“ 8, 1932: 199-222.

TOMAN J. (Областной ветеринарный пункт, Пардубице, Чехословакия). *Оценка серологических исследований на бедсонияз племенных быков и отношение к плодовитости.* Vet. med. (Praha) 13 (7): 409-414, 1968.

В предложенной работе описывают оценку серологических исследований 284 племенных быков и обсуждают отношение уровня титров к плодовитости. В группе 64 быков с положительным титром (22,6 %) не обнаружили существенного различия ни при сравнении с плодовитостью после первого годового искусственного осеменения, ни в месяце исследования в группе быков без титра. Определенное различие появилось только в группе животных с титром 1:16 и выше, но так как в этой группе находилось лишь 49 животных, нельзя из приведенного исследования выводить заключения. Так как в настоящее время этим вопросом никто не занимается, необходимо обратить на этот факт внимание и уделять ему соответствующее внимание, одинаково как и вопросам присутствия этого инфекционного агента вне половых органов.

enzootическое бесплодие крупного рогатого скота; бедсонии; антитела в кровяной сыворотке.

TOMAN, J. (The Central State Veterinary Institute, Pardubice, Czechoslovakia). *Evaluation of Serological Examinations of Breeding Bulls for Bedsoniosis and its Relation to Fertility.* Vet. Med. (Praha) 13 (7): 409-414, 1968.

In this work an evaluation was performed of the serological findings made in 284 breeding bulls and of the relation of the level of titres to fertility. In a group of 64 bulls with a positive titre (22.6 per cent) no substantial differences were found in a comparison with the fertility after the 1st whole year's insemination and neither in the month of examination in the group of bulls without any titre. Certain differences were found only in a group of animals with a titre of 1:16 and over, but as this group consisted only of 49 animals, no conclusions can be drawn from the mentioned examinations. As at the present time nobody is dealing with this problem systematically, it is necessary to point out this fact and to pay appropriate attention to it the same as to the problem of the extragenital presence of this infectious agents.

enzootic infertility of cattle; bedsonia; antibodies in the blood serum.

TOMAN, J. (Zentrales Staatsveterinärinstitut, Pardubice, Tschechoslowakei) *Die Bewertung der serologischen Untersuchungen auf Bedsoniose der Zuchtbullen und die Beziehung zur Fruchtbarkeit.* Vet. Med. (Praha) 13 (7): 409-414, 1968.

In der vorgelegten Arbeit wurde die Bewertung der serologischen Befunde bei 284 Zuchtbullen durchgeführt und die Beziehung des Titerpiegels zur Fruchtbarkeit eingeschätzt. In einer Gruppe von 64 Bullen mit dem positiven Titer (22,6%) wurde kein wesentlicher Unterschied weder beim Vergleich mit der Fruchtbarkeit nach der I. ganzjährigen künstlichen Besamung, noch im Monat der Untersuchung in einer Gruppe von Bullen ohne den Titer festgestellt. Gewisse Unterschiede kamen bloß in der Gruppe von Tieren mit dem Titer 1:16 und mehr vor; da es sich aber nur um eine Gruppe von 49 Tieren handelte, können aus angegebenen Untersuchungen keine Schlußfolgerungen gezogen werden. Da sich zur Zeit niemand mit dieser Frage systematisch beschäftigt, ist es notwendig, auf diese Tatsache hinzuweisen und ihr eine entsprechende Aufmerksamkeit, ebenfalls wie den Fragen der extragenitalen Anwesenheit dieses infektiösen Agens zu widmen.

enzootische Unfruchtbarkeit des Rindes; Bedsonie; Antikörper im Blutserum.

Adresa autora:

MVDr. Josef Toman, ÚSVÚ, Stanice laboratorní a klinické diagnostiky a terapie, Pardubice

AKTIVITA ALKALICKÉ FOSFATÁZY V KREVNÍM SÉRU SKOTU ZA RŮZNÝCH FYZIOLOGICKÝCH PODMÍNEK

J. Konrád, V. Kroupová

I. Interní klinika veterinární fakulty VŠZ v Brně

Katedra veterinárních disciplín PEF VŠZ v Čes. Budějovicích

KONRÁD, J., KROUPOVÁ, V. *Aktivita alkalické fosfatázy v krevním séru skotu za různých fyziologických podmínek.* Vet. Med. (Praha) 13 (7) : 415—422, 1968.

Sledováním aktivity alkalické fosfatázy krevního séra u 60 kusů dojnic a 53 jalovic bylo potvrzeno, že u skotu po dvou letech stáří nedochází již k podstatným změnám v její hladině. Zatímco u téhož individua byla prokázána určitá stabilita aktivity alkalické fosfatázy, mezi jednotlivými zvířaty zjišťujeme značné variační rozpětí. Statisticky významné rozdíly byly potvrzeny u souborů ověřované populace, pokud se týká vlastní zoohygienické úrovně chovu. Gravidita podmiňuje aktivitu alkalické fosfatázy u jalovic s nejvyššími hodnotami v pátém měsíci březosti.

enzymy; fyziologické standardy; klinicko-laboratorní diagnostika; klinická fyziologie.

Stále rostoucí význam aktivního zabezpečování a udržování uspokojivého zdravotního stavu zvířete si vyžaduje soustavné hledání a ověřování takových vyšetřovacích postupů, které by podaly dostatečný obraz o fyziologickém a patofyziologickém stavu sledovaného jedince, jako individuálního článku celé populace produkčně využívaných zvířat. Mezi takoveto vyšetřovací postupy patří v posledních letech především nejrozsáhlejší biochemická sledování, aplikovaná pak do praktické činnosti kliniky. V současné době sem patří i sledování aktivity alkalické fosfatázy.

Alkalická fosfatáza, řazená do skupiny esteráz patří mezi nezbytné články intermediálního metabolismu vůbec a zúčastňuje se hlavně při odbourávání a tvorbě bílkovin, uhlohydrátů i lipidů a je tedy prakticky přítomna ve všech tkáních těla (Bersin 1954, Bräutigam 1957, Ammon a spol. 1959). Pokud jde o její hodnocení v krevním séru skotu, považuje za fyziologické hodnoty Verter a Swanton (1964) u zvířat do stáří půl až jednoho roku 11,55, do tří let 4,28 a nad tři léta 5,34 j. KA. Naproti tomu jako průměrnou hodnotu u zdravého dospělého skotu udává Kolb (1962) 10,9 a u telat 28,7 j. KA. Široké působení alkalické fosfatázy v intermediálním metabolismu vedlo některé autory i k vyhodnocení její aktivity v korelaci s určitými produkčními vlastnostmi. Sem patří signifikantní rozdíly pokud se týká přírůstků (Fletcher a spol. 1956). Nebyly potvrzeny rozdíly její hodnoty v krevním séru mléčného a masného typu (Kunkel a spol. 1954), ani její závislost na graviditě a laktaci (Rako a spol. 1966).

Za patofyziologických stavů dochází k různým změnám její hladiny. Týká se to hlavně onemocnění kostní tkáně (Kolb a spol. 1962), leukózy skotu (Verter a Swanton 1964), gastroenteritid telat (Kwiatkowski

1964). Při celkovém znecitlivění skotu zabýval se sledováním její aktivity Pavlica (1968). V humánní medicíně kromě řady onemocnění je sledována i při jaterních poruchách Hoening (1966).

MATERIÁL A METODY

Alkalická fosfatáza byla sledována u dojníc a jalovic držených za různých odlišných podmínek chovu. Stručný popis jednotlivých chovů, krmných dávek a ošetrovatelské úrovně je uveden v tab. I. Krev byla odebírána z *vena jugularis* celkem třikrát v období 3–4 měsíců.

Alkalická fosfatáza byla sledována kolorimetrickou metodou podle Kinga a Armstronga (1946). Dosažené výsledky jsou rovněž uváděny v jednotkách King-Armstrongových (j. KA) a jsou statisticky vyhodnoceny.

VÝSLEDKY

STAŘÍ ZVÍŘETE

Z tabulky II, zachycující souhrnně hodnoty alkalické fosfatázy u 53 kusů jalovic ve stáří 2–3 let a 60 kusů dojníc ve stáří 4–11 let, držených v pěti odlišných chovech, je zřejmé, že průměrná hodnota u jalovic (9,35 j. KA) je poněkud vyšší oproti hladinám u dojníc (průměru 8,78 j. KA). Tento rozdíl však není statisticky významný ($t = 0,64$) a je tedy možno konstatovat, že u skotu po dvou letech stáří nedochází již k výrazným změnám v hladině alkalické fosfatázy, způsobeným stářím zvířat.

DRUHOVÁ A INDIVIDUÁLNÍ PŘÍSLUŠNOST

Porovnáme-li individuální hladiny alkalické fosfatázy u nahodile vybraných 12 dojníc chovaných na farmě D a stejný počet dojníc na farmě E (tab. III.), pak zjišťujeme poměrně značné rozpětí u jednotlivých zvířat, především na farmě D. Naproti tomu však u těchto jedinců při opakovaném sledování intervalu 4 měsíců vykazují tito jedinci určitou stabilitu. Z tab. III. můžeme zjistit, že kupř. dojnice č. 1, 6, 11 z chovu D vykazují trvale hodnoty přesahující průměr, zatímco dojnice č. 2, 8, 12 si udržují v porovnání s průměrem celého souboru trvale nižší hladinu a ostatní se pak pohybuje těsně kolem tohoto průměru. Výjimku činí pouze dojnice č. 7, u které došlo k prudkému vzestupu s rozdílem až 20 jednotek mezi odběrem v květnu a červenci.

ZOOHYGIENICKÁ ÚROVEŇ CHOVU

Porovnáme-li průměrné hladiny mezi oběma chovy dojníc (D, E), pak zjišťujeme, že zvířata v chovu E vykazují statisticky výrazně nižší hodnoty o 3,14 jednotek ($t = 2,21$). Na tomto rozdílu se nápadně podílí právě zvýšení u dojníc mezi odběry krve v měsíci květnu a červenci, a to zvláště dojnice, které byly počátkem dubna krátce po otelení (chov D).

Pokud jde o hodnocení aktivity alkalické fosfatázy mezi sledovanými chovy jalovic, pak jsme potvrdili statisticky významně nižší hodnoty v chovu B, a to jak ve srovnání s chovem A ($t = 2,68$), tak i chovem C ($t = 2,27$).

I. Přehled krmných dávek, ošetřování a způsobů chovu

Označení chovu	Datum odběru	Krmná dávka					Ustájení	Poznámka
		seno	siláž	jadr. krmivo	zelené kr.	různé		
A	23. 11.	5	20 (směska)	0,8	—	—	dvouřadý kravín vel. dobré ustáj.	výborná kondice březí jalovice
B	1. 12.	8	5	0,8	—	—	čtyřřadý kravín, ve stáji teplo, dostatek podestýlky, ošetřování dobré	březí jalovice
C	10. 1.	4	10 (podzim. směska)	1,0	—	—	dvouřadý kravín, teplota stáje 5 °C	březí jalovice špatná kondice
D	6. 4.	7	25	2,0	—	1,5 mláto	klasická selská stáj dobré hyg. a mikrokl. podmínky	dojnice dojivost: 4000 3500
	27. 4.	7	30	2,5	—	3,0 bramb.		
	25. 5.	—	—	—	35 směska	2,0 mláto		
	14. 7.	—	—	2,0	50 jetel		dvouřadý kravín prům. podmínky	dojnice dojivost: 2900
	7. 5.	4	—	2,0	35 směska	2,0 mláto		
E	1. 6.							
	14. 7.			2,0	60 směska	2,0 mláto		

II. Souhrnné hodnoty alkalické fosfatázy v krevním séru skotu ve vztahu ke stáří

Skot stáří (rok)	n	$\bar{x}$	s	Rozdíl pro	t
Jalovice 2—3 r.	53	9,35	3,5	Jal./doj. 0,57	0,64
Dojnice 4—11 r.	60	8,78	5,6		

III. Přehled dynamiky jednotlivých hodnot aktivity alkalické fosfatázy v krevním séru dojnic

Označení chovu	Poř. čís. dojnice	Gravidita	Datum				
			27. 4. 67	7. 5. 67	25. 5. 67	1. 6. 67	14. 7. 67
D	1	I	—		26,7		22,4
	2	I	2,4		5,7		—
	3	I	—		10,5		6,0
	4	VII	7,05		13,3		7,8
	5	VII	7,1		3,0		—
	6	VIII	15,9		16,8		15,5
	7	IX	.		3,0		23,1
	8	IX	4,6		4,2		6,9
	9	+	6,6		10,2		—
	10	+	7,5		12,6		8,3
	11	+	10,8		20,7		14,5
	12	+	2,1		9,7		5,8
	$\bar{X}$		7,12		11,7		11,3
	s ±		4,3		6,7		6,8
	Vk		60,4		57,3		60,2
E	1	I		—		—	21,6
	2	I		4,6		2,4	—
	3	I		5,6		9,7	6,3
	4	I		4,9		3,6	4,4
	5	I		13,5		18,9	—
	6	II		8,5		6,0	4,4
	7	IV		4,4		5,8	—
	8	VII		3,5		5,4	4,4
	9	VII		5,5		7,5	6,0
	10	IX		6,8		7,9	5,1
	11	IX		6,9		15,0	7,6
	12	+ paresa		4,2		2,4	—
	$\bar{X}$			6,22		8,0	7,47
	s ±			3,7		4,7	5,4
	Vk			59,5		58,8	72,3

Poznámka: + = krátce po otelení

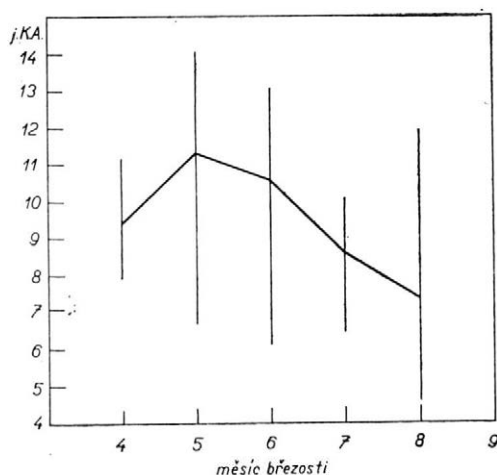
IV. Přehledná tabulka průměrných hodnot alkalické fosfatázy v jednotlivých chovech a statistická významnost jejich rozdílů

Označení chovu	n	$\bar{x}$	s	Rozdíl pro	t
A	16	9,87	2,5	A/B 2,12	2,68
B	18	7,75	2,1	B/C 2,68	2,27
C	19	10,43	4,5	A/C 0,56	0,49
D	30	10,35	6,5	—	—
E	30	7,21	4,4	D/E 3,14	2,21

Mezi oběma posledními chovy (A, C) nebyl prokázán statisticky významný rozdíl ($t = 0,49$). Nejvyšší průměrnou hladinu vykazují jalovice v chovu C s 10,43 jednotkami KA (tab. IV).

GRAVIDITA

Vyšetřením 35 kusů gravidních jalovic v různém období březosti bylo prokázáno, že nejvyšší aktivitu alkalické fosfatázy vykazují jalovice v pátém měsíci gravidity. Tento poznatek byl potvrzen na základě vyhodnocení gravidních jalovic v obou chovech A a C, mezi nimiž nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl v aktivitě alkalické fosfatázy. Tato závislost je dobře patrna z grafu 1. Vyhodnocení vlivu gravidity u zvířat starších zde neuvádíme vzhledem k malému počtu prověřovaných jedinců v jednotlivých měsících březosti.



Alkalická fosfatáza v krevním séru březích jalovic

DISKUSE

V práci zabývali jsme se sledováním aktivity alkalické fosfatázy u 60 kusů dojnic a 53 kusů jalovic chovaných v pěti samostatných farmách. Sledovali jsme hladinu alkalické fosfatázy u jednotlivých zvířat ve vztahu ke stáří, druhové a individuální příslušnosti, zoohygienické úrovni chovu, graviditě, i z hlediska dynamiky této hladiny.

Opakovaná šetření prokázala výraznou rozdílnost pokud se týká této aktivity mezi jednotlivými zvířaty, naproti tomu však při opakovaných šetřeních byla potvrzena poměrně značná stálost určité úrovně aktivity alkalické fosfatázy u téhož jedince. Toto zjištění svědčí o pravděpodobném genetickém založení tohoto enzymatického systému, jak na to poukazuje také i Fletcher, Shrode a Kunkel (1956). Poněvadž i produkční schopnost je založena geneticky, bylo by jistě vhodné další sledování vzájemné její závislosti a aktivity alkalické fosfatázy v krevním séru. V našich případech potvrzujeme také

i nižší hodnoty aktivity alkalické fosfatázy u dojnic chovu E, které vykazují o 1000 litrů nižší průměrnou roční dojivost.

Naše zjištění nesouhlasí zcela s údaji R a k o a M i k u l e c e (1966), že laktace neovlivňuje úroveň aktivity alkalické fosfatázy, neboť v našem sledování došlo u dojnic obou chovů k jejímu zvýšení v krátkém období po otelení, tedy ve fázi vrcholné laktace. Poukazuje to opětovně na to, že současné zatížení konečného období gravidity a vrcholné fáze laktace zasahuje při naší úrovni chovu dojnic především značně do stavu minerálních dep a vyžaduje proto náležitou pozornost hlavně u vysoce produktivních zvířat.

Mezi aktivitou alkalické fosfatázy jalovic a dojnic nebyl zjištěn statisticky významný rozdíl a lze se proto domnívat, že stáří skotu po dosažení dvou let se již nijak výrazně na úrovni aktivity fosfatázy neuplatňuje.

Pokud si však blíže všímáme hodnot alkalické fosfatázy u jalovic ve vztahu k chovatelské úrovni jednotlivých prověřovaných farem, pak jsme potvrdili statisticky významný rozdíl s nižšími hodnotami u jalovic v chovu B. Tento chov se v porovnání s ostatními dvěma (A, C) liší především v podstatně nižším procentu zkrmované siláže, jejíž vliv na metabolismus minerálů, související velmi úzce s úrovní aktivity fosfatázy, je obecně uváděn R a k o (1963), H n o e v ý j (1964). Naproti tomu chovy A a C nevykazují statisticky průkazné rozdíly ($t = 0,26$), i když rozdíl v množství zkrmované siláže mezi oběma těmito chovy je rovněž podstatný a také celková ošetrovatelská péče nebyla zde na požadované úrovni, o čemž svědčí dosti špatná kondice vyšetřovaných jalovic. Znamená to tedy, že exogenní vlivy i samotné složení krmiva je jen určitým limitujícím faktorem ve vztahu k aktivitě alkalické fosfatázy.

Třebaže jsme nemohli pro malý počet zvířat v jednotlivých měsících gravidity vyhodnotit její vliv na aktivitu tohoto enzymu u starších zvířat, prokázali jsme u jalovic zvýšení její hodnoty v pátém měsíci březosti, tedy na počátku období zvýšené potřeby zásobování plodu. Tyto výsledky jistě podporují nutnost hlubšího sledování minerálního metabolismu v tomto období, kdy vzniká určitá disharmonie jako následek probíhajících adaptačních procesů ve smyslu vyšší utilizace minerálních látek pro krytí zvýšené potřeby v tomto období u primipar.

Dosažené výsledky považujeme za základní hodnoty pro možnost dalšího využití a rozpracování sledování aktivity alkalické fosfatázy v klinické fyziologii i z hlediska hodnocení kritérií chovatelské užitkovosti.

Došlo dne 3. 1. 1968

Literatura

1. AMMON, R. - DIRSCHER, W.: Fermente, Hormone, Vitamine. Stuttgart, 1959.
2. BERSIN, T.: Kurzes Lehrbuch der Enzymologie. Leipzig, 1954.
3. BRÄUTIGAN, G.: Untersuchungen über die Aktivität der alkalischen Serum-phosphatase bei einigen inneren Krankheiten des Hundes. = „Vet. Med. Diss.“ Berlin, 1957.
4. FLETCHER, J. - SHRODE, R. - KUNKEL, O.: Serum alkaline phosphatase and hain in Brahman cattle. = „J. Animal Sci.“, 15, 1956: 119-124.
5. HOENIG, V.: Choroby jater a žlučových cest v praxi. SZN, Praha, 1966.
6. HNOEVÝJ, V.: Dejaky azotni frakcii ta fosfor syrovatki krvi telic pry tryva-

- lomo zhoduvanii kukurudzianoho sylosu z dobavkoju sečovyny ta amijačnoji vody. = „Visnyk silskohosp. Nauky“, 8, 1965: 92-95.
7. KING, E.: Microanalysis in Medical Chemistry. London, 1946.
 8. KOLB, E. a kol.: Lehrbuch der Physiologie der Haustiere. Jena, 1962.
 9. KONRÁD, J. - KROUPOVÁ, V.: Množství popele v srsti skotu. = „Čsl. fyziologie“ v tisku 1967.
 10. KUNKEL, H. - STUTTS, E. - SHRODE, R.: The individuality of the level of blood glutathion in young beef cattle. = „J. Animal Sci“ 13, 1954: 852-857.
 11. KWIATKOWSKI, T.: Aktywność fosfatazy alkalicznej u cielat zdrowych i chorych z objawami biegunu. = „Medycyna Weterynaryjna“, 20, 1964: 291-293.
 12. PAVLICA, J.: Vliv celkového znečistlivění na aktivitu enzymů krevního séra skotu. = „Sborník VF VŠZ Brno.“ 1968 (v tisku).
 13. PETERKOVÁ, M.: Srovnání hladiny hořčiku v krevním seru a srsti skotu. Dipl. práce VŠZ Č. Budějovice, 1967.
 14. RAKO, A. - MIKULEC, K.: Über den biochemischen Test bei Haustieren. = „Züchtungskunde“, 38, 1966: 289-300.
 15. SUCHÁ, J.: Srovnání hladiny fosforu v krevním seru a v srsti skotu. Dipl. práce VŠZ, Č. Budějovice, 1967.
 16. VERTER, W. - SWANTON, R.: Die Aktivität der alkalischen u. saueren Phosphatase im Blutserum von Rindern, Schafen und Kamelen unter besonderer Berücksichtigung der lymphatischen Leukose des Rindes. = „Mnft.f.Vet.Med.“, 19, 1964: 384-390.

KONRAD J., KROUPOVA V. (I terapeutická klinika Veterinárního fakulty v Brně, Katedra veterinárních disciplín Produkčně-ekonomického fakulty Selského hospodářského institutu v Českých Budějovicích, Československo). Aktivita alkalické fosfatasy v krevní sérumě velkého rohatého skotu v různých fyziologických podmínkách. Vet. med. (Praha) 13 (7) : 415-422, 1968.

V průběhu zkoumání alkalické fosfatasy séra krve u 60 dojnic a 53 telok bylo potvrzeno, že u velkého rohatého skotu v dvouletém věku existují významné změny v její úrovni. Pokud jde o jednu a tu samou osobu, je stanovena určitá stabilita aktivity alkalické fosfatasy, to mezi jednotlivými zvířaty se vyskytuje značný variabilní rozsah. Statisticky významné rozdíly u celkové zkoumané populace jsou doloženy vzhledem k vlastnímu zoohygienickému stavu stáda. Stělnost ovlivňuje aktivitu alkalické fosfatasy u telok s maximálními velikostmi na pátém měsíci stělnosti.

enzymy; fyziologické normy; klinicko-laboratorní diagnostika; klinická fyziologie.

KONRÁD, J., KROUPOVÁ, V. (Ist Internal Clinic of the Veterinary Faculty of the Agricultural University in Brno, Chair of Veterinary Disciplines of the Operational-Economic Faculty of the Agricultural University in Čes. Budějovice, Czechoslovakia) *The Activity of Alkaline Phosphatase in the Blood Serum of Cattle under Different Physiological Conditions*. Vet. Med. (Praha) 13 (7) : 415-422, 1968.

Investigation of the activity of alkaline phosphatase in the blood serum of 60 dairy cows and of 53 heifers confirmed the fact that in cattle of an age of over two years there occur no longer any substantial changes in its level. Whereas in one and the same individual a certain stability of the activity of alkaline phosphatase could be proved, a considerable variational range was ascertained to exist between the different animals. Statistically significant differences were confirmed in the groups of checked populations as regards the actual zoohygienic standard of the herd. Gravity induces the activity of alkaline phosphatase in heifers with the highest values in the fifth month of pregnancy.

enzymes; physiological standards; clinico-laboratory diagnosis; clinical physiology.

KONRÁD, J., KROUPOVÁ, V. (I. Interne Klinik der Veterinärfakultät der Landwirtschaftlichen Hochschule in Brno, Lehrstuhl der Veterinärdisciplinen, Betriebsökonomische Fakultät der Landwirtschaftlichen Hochschule in České Budějovice, Tschechoslowakei) *Die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Blutserum des Rin-*

des unter verschiedener physiologischer Bedingungen. Vet. Med. (Praha) 13 (7): 415—422, 1968.

Durch die Verfolgung der Aktivität der alkalischen Phosphatase des Blutserums bei 60 Stück Milchkühen und 53 Färsen wurde bestätigt, daß beim Rind nach zwei Jahren des Alters es nicht mehr zu wesentlichen Änderungen in ihrem Spiegel kommt. Während bei demselben Individuum eine bestimmte Stabilität der Aktivität der alkalischen Phosphatase nachgewiesen wurde, stellen wir unter den einzelnen Tieren eine bedeutsame Variationsspannweite fest. Statistisch bedeutungsvolle Unterschiede wurden bei Gesamtheiten der beglaubigten Population bestätigt, sofern es sich um das eigene zoohygienische Niveau der Zucht handelt. Die Gravidität bedingt die Aktivität der alkalischen Phosphatase bei Färsen mit den höchsten Werten im fünften Monat der Trächtigkeit.

Enzymen; physiologische Standards; klinisch-laboratorische Diagnostik; klinische Physiologie.

Adresy autorů:

Prof. MVDr. Jaroslav K o n r á d, CSc., vedoucí I. Interní kliniky veterinární fakulty VŠZ, Brno, Palackého 1—3

Ing. Vlasta K r o u p o v á, VŠZ, provozně ekonomická fakulta, katedra veterinárních disciplin, České Budějovice

Vedoucí: Doc. dr. J. Zuda, CSc.

K PŘÍPRAVĚ IMUNNÍCH GLOBULÍNŮ PROTI PSINCE A INFEKČNÍ HEPATITIDĚ PSŮ

E. Jiran, G. Petr, Z. Urbánek

Bioveta Terežín

JIRAN, E., PETR, G., URBÁNEK, Z. *K přípravě imunních globulínů proti psince a infekční hepatitidě psů.* Vet. Med. (Praha) 13 (7) : 423—430, 1968.

Byla provedena úspěšná imunizace koně proti psince a infekční hepatitidě psů souběžně. Je popsán způsob přípravy a koncentrace imunních globulínů, testy neškodnosti a hodnocení jejich aktivity v neutralizačních testech. Koncentrace imunních globulínů umožňuje snížení imunizační dávky oproti hyperimunnímu séru na 20 % původního objemu. Terénní ověření imunních globulínů dalo kladné výsledky.

imunizace koně virem psinky a virem infekční hepatitidy psů souběžně; příprava koňských sérových globulínů; hodnocení aktivity imunních globulínů.

K pasivní imunizaci psů a kožesinových zvířat proti psince a infekční hepatitidě psů se v posledních letech používalo bivalentní hyperimunní sérum, lyofilizované, homologní, tj. připravené z krve hyperimunizovaných psů. Výroba byla značně náročná a dosti nákladná vzhledem k nutnému zástavu většího množství dospělých psů větších plemen, dlouhodobému ošetřování produkčních zvířat při relativně malé výtěžnosti séra. Vlastní sérum však bylo vysoce účinné a vysoký obsah specifických protilátek zaručoval dobrou ochranu proti oběma infekčním chorobám.

V dalším programu měl vývoj tohoto séra směřovat k purifikaci vlastních protilátek, k odstranění balastních složek séra, případně ke koncentraci obsahu protilátek na menší objem pro snadnější dávkování. V této fázi vývoje tohoto preparátu jsme přistoupili k tomu, ověřit vhodnost přípravy séra na velkém produkčním zvířeti a další ověření purifikace a koncentrace provést z heterologního séra.

Již v r. 1953 píše P a n k o v o pokusech připravit léčebné sérum proti psince z koně. Dále se zabývají zpracováním metodiky hyperimunizace koně proti psince práce francouzských autorů M a c k o w i a k a spol. (1959), N i c o l a spol. (1959) a Y e u a spol. (1959), kteří zde získali dobré výsledky zejména s infekčním materiálem viru psinky kultivovaného na kuřecích embryích nebo na tkáňových kulturách. Při použití materiálu viru psinky z orgánů infikovaných zvířat, zejména fretek, bylo nutno získaná hyperimunní séra podrobit ještě detoxikaci.

Všechny práce se však zabývají pouze přípravou monovalentního séra proti psince.

P o p e s c u a spol. (1962) popisuje imunizaci koně proti infekční hepatitidě psů. Používá materiál viru infekční hepatitidy psů, kultivovaného na tkáňových kulturách ledvinných buněk selat a po hyperimunizaci získává v séru vysoký obsah protilátek.

Tato práce se zabývá přípravou pouze monovalentního séra proti infekční hepatitidě psů.

O výhodách použití imunních globulínů u virových chorob psů píše rovněž L a r i n a spol. (1954).

V předloženém sdělení chceme referovat o možnosti přípravy bivalentního hyperimunního séra z velkého produkčního zvířete — z koně a dále o jeho purifikaci a koncentraci spolu s vyhodnocováním imunní složky séra.

M A T E R I Á L A M E T O D I K A

Virus. Pro imunizaci a hyperimunizaci byl používán virus psinky (FCC) kmen „ONDERSTEPOORT“ (H a i g, 1956) adaptovaný na kuřecí embrya nebo na tkáňové kultury kuřecích embryonálních buněk.

Dále virus infekční hepatitidy psů (HCC) adaptovaný na tkáňové kultury epiteliálních buněk ledvin selat, označený jako kmen „CORNELL-I/SL“. Kultivace virových kmenů byla prováděna podle postupu uvedeného v níže citovaných publikacích.

Imunizační schémata. Používali jsme způsobů popsaných uvedenými autory, jak je i dále podrobněji uvádíme v úseku výsledky práce.

Tkáňové kultury. Pro pomnožení viru FCC jsme používali tkáňové kultury kuřecích embryonálních buněk (TK KEB). Pro pomnožení viru HCC, jeho titrace a pro neutralizační testy na HCC kultury ledvinných buněk selat (TK SL) a kultury psích ledvinných buněk (TK PSL). Jejich příprava byla popsána již dříve (J i r a n 1964, 1965, 1966).

Neutralizační test (NT). Pro vyhodnocování sér jsme používali NT, kde jsme k vzestupnému ředění séra nebo imunních globulínů přidávali stejný objem přibližně 500 ID₅₀ viru psinky nebo viru infekční hepatitidy psů, nechali jsme směs inkubovat 60 minut při pokojové teplotě a aplikovali na zkumavkové kultury TK PSL pro virus HCC, resp. na chorioallantoidní blány kuřecích embryí pro virus FCC. Změny po viru HCC jsme odečítali a hodnotili za 5–7 dní inkubace, změny po viru FCC za 6 dní inkubace při 37 °C. Neutralizační aktivitu jsme vyhodnocovali podle R e e d a a M u e n c h e (1938) a vyjadřovali jako ND₅₀, tj. jako 50% neutralizační dávku.

Pokusná a produkční zvířata. Pro imunizační pokus k přípravě hyperimunního séra byla použita klisna ve stáří 11 let, klinicky zdravá.

Pro zkoušku neškodnosti globulinových frakcí koňského séra byla použita štěňata ve stáří kolem 3–5 měsíců a dále starší dospělí psi do stáří 5 let, klinicky naprosto zdraví.

V Ý S L E D K Y P R Á C E

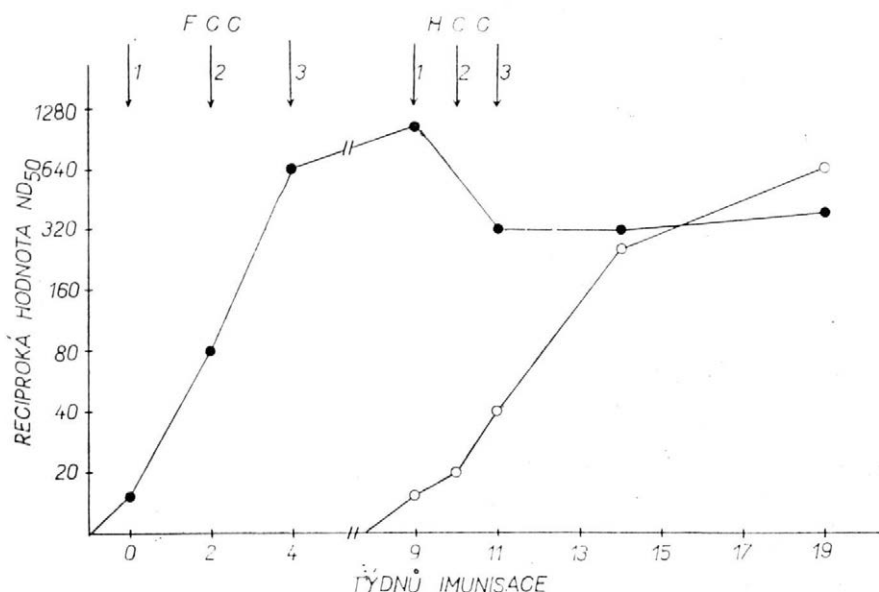
1. IMUNIZACE KONĚ PROTI PSINCE

Pro imunizaci a hyperimunizaci koně proti psince jsme vycházeli z prací francouzských autorů (M a c k o w i a k a spol. 1959, N i c o l a spol. 1959) a základní imunizační schéma jsme dále volili podle jejich údajů. Hyperimunizaci jsme pak upravili podle našich podmínek (Tabulka I.).

Pro základní imunizaci jsme používali virus psinky z chorioallantoidních blan kuřecích embryí v 20–30% suspenzi s obsahem přibližně 10⁵ KE ID₅₀ viru. Aplikovali jsme jej vždy intramuskulárně v dávce 10,0–20,0 ml. Pro

hyperimunizaci jsme někdy použili rovněž viru FCC z TK KEB s přibližně stejným obsahem viru. Suspenze viru k imunizaci obsahovala vždy antibiotika (penicilin a streptomycin v množství 500 j., resp. 500 gama/ml). Ani v jednom případě se po aplikaci virové suspenze nedostavily lokální či celkové reakce.

Průběh vývoje tvorby protilátek během imunizace je znázorněn v grafu. 1.



Graf 1. Průběh tvorby protilátek proti FCC a HCC během imunizace koně
FCC (1, 2, 3): Imunizace proti psince ve 14-denních intervalech
HCC (1, 2, 3): Imunizace proti infekční hepatitidě psů v týdenních intervalech

● : Hodnoty neutralizačních protilátek proti FCC

○ : Hodnoty neutralizačních protilátek proti HCC

2. IMUNIZACE KONĚ PROTI INFEKČNÍ HEPATITIDĚ PSŮ

Pro imunizaci a hyperimunizaci koně proti HCC jsme volili základní postup podle Popescu a spol. (1962). Další hyperimunizaci jsme dále sladili s postupem hyperimunizace proti FCC (schéma je uvedeno v tabulce I).

Imunizační dávka modifikovaného viru HCC z TK SL obsahovala vždy 10^5 – 10^6 TK ID₅₀ a podávali jsme ji rovněž intramuskulárně v množství 10,0–20,0 ml.

Průběh vývoje tvorby protilátek proti HCC během imunizace je znázorněn rovněž v grafu 1.

3. ZPRACOVÁNÍ SÉRA A ZÍSKÁNÍ IMUNNÍCH GLOBULÍNŮ

Odběry krve pro zpracování jsme prováděli z *Vv. jugulares* koně. Pro menší vzorky jsme odebírali 20–30 ml krve, pro velké odběry k dalšímu zpracování jsme odebírali zpravidla 1 % živé váhy koně, tj. přibližně 6 l krve najednou.

Krev jsme nechali srazit ve vysokých krevních válcích o obsahu 1,5 l při pokojové teplotě a dále jsme ji ukládali na 18–42 hodin při 4 °C. Slitím a opakovanou centrifugací jsme získali sérum. Výtěžnost séra z krve se pohybovala kolem 40 %.

I. Imunizace koně proti psince a infekční hepatitidě psů

Imunizace proti	1.	2.	3.	4.	5.	6.★)
FCC	14. 9.	28. 9.	12. 10.	7. 12.	25. 1.	27. 2.
HCC	17. 11.	24. 11.	1. 12.	7. 12.	25. 1.	27. 2.

★) = Další hyperimunizace koně byly prováděny přibližně v šestitýdenních intervalech vždy oběma virovými antigeny současně. Prvý větší odběr krve byl proveden 21. 12. a další odběry navazovaly na hyperimunizace a byly prováděny zpravidla za 2–3 týdny po aplikaci virových antigenů.

Protilátkovou frakci séra jsme získávali vysolováním síranem amonným. K 1 l séra bylo přivázeno 210 g pevného síranu amonného. Po rozpuštění byl vzniklý sediment odstředěn při 2 400 X g po dobu 35 minut, supernatant slit a sediment resuspendován v roztoku síranu amonného (1 l destilované vody + 240 g síranu amonného). Znovu odstředěno, supernatant slit a postup opakován ještě jednou. Takto promytá sraženina globulínů pak byla přenesena na celofán a dialyzována 18 hodin proti tekoucí vodovodní vodě, pak 24 hodin proti 0,4 % roztoku NaCl. Dialyzát byl naředěn do polovičního objemu výchozího séra, filtrován přes sterilní vrstvu EK, přidán merthiolát do celkové koncentrace 1 : 25 000 a lyofilizován v lyofilizačním přístroji KS 6. Lyofilizát po rozpuštění v destilované vodě v objemu dvaapůlkrát menším než výchozí sérum nám dával zhruba pětikrát koncentrované imunní globulíny.

Elektroforetický záznam takto připravených globulínů v porovnání s výchozím sérem je uveden na grafu 2.

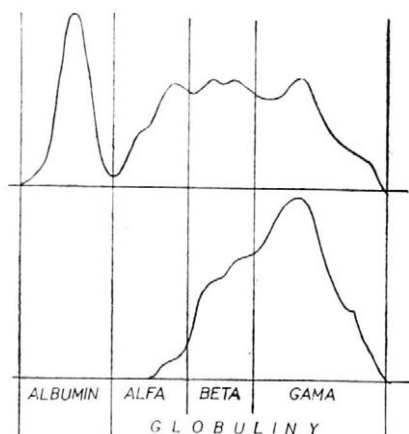
Na grafu 2 lze jasně vidět, že u čistěných imunních globulínů chybí albumínová frakce vůbec, frakce alfa-globulínů je přítomna pouze ve stopách a částečně je snížena i frakce beta-globulínů. Výchozí koňské sérum bylo tedy z největší části zbaveno balastních bílkovin.

4. ZKOUŠKA NEŠKODNOSTI GLOBULÍNOVÝCH FRAKcí KOŇSKÉHO SÉRA

Neškodnost globulínových frakcí koňského séra jsme testovali jednak časově před imunizačními pokusy a připravili jsme proto globulíny z normálního koňského séra popsáním způsobem vysolováním síranem amonným. Použili jsme šest štěňat, kterým jsme podkožně aplikovali po 50,0 ml roztoku globulínů. V přepočtu na předpokládanou dávku hyperimunního séra to představovalo přibližně 4–5násobek používaného množství séra.

Štěňata jsme sledovali po dobu jednoho týdne. Po aplikaci globulínů se nedostavily ani lokální, ani celkové reakce a všechna pokusná zvířata zůstala klinicky naprosto zdravá.

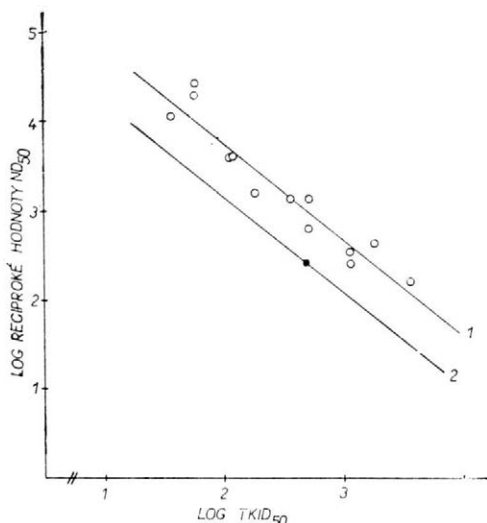
Pro další pokus se zkouškou neškodnosti globulínových frakcí koňského séra jsme použili imunní globulíny připravené z hyperimunizovaného koně. Imunní globulíny jsme aplikovali v množství po 50,0 ml pětikrát koncentrovaných globulínů podkožně pěti dospělým psům, což představovalo více než pětínásobek nejvyšší předpokládané dávky imunních globulínů. Stejnou dávku globulínů jsme opakovali všem psům za 48 hodin. Pokusná zvířata jsme sledovali po dobu 14 dnů. Ani po dvojí aplikaci imunních globulínů v pětínásobné dávce se nedostavily ani lokální, ani celkové reakce u očkovaných zvířat, která zůstala během celého sledovaného období klinicky naprosto zdravá.



Graf 2: Elektroforetický záznam imunních globulínů proti FCC a HCC

Horní záznam: Výchozí nečištěné koňské sérum

Dolní záznam: Totéž sérum po purifikaci a koncentraci



Graf 3: Závislost titrů neutralizačních protilátek proti HCC na množství viru použitého k neutralizaci

Přímka 1: Regresní přímka $y = 5,95 - 1,089 x$

Přímka 2: Rovnoběžka s regresní přímkou procházející bodem požadované normy pro hyperimunní sérum proti FCC a HCC v přepočtu na pětinasobnou koncentraci imunních globulínů.

Těmito pokusy jsme ověřili neškodnost globulínů koňského séra za experimentálních podmínek, což bylo dále rovněž potvrzeno i při terénním ověřování imunních globulínů.

5. HODNOCENÍ ÚČINNOSTI IMUNNÍCH GLOBULÍNŮ PROTI FCC A HCC

Pro hodnocení účinnosti imunních globulínů jsme volili průkaz neutralizačních protilátek, kde jsme hodnotili vzorky koňského séra během celé imunizace jak proti FCC, tak proti HCC. Výsledky jsou uvedeny již v grafu 1.

Po imunizaci koně virem psinky a virem infekční hepatitidy psů dochází k plynulému vzestupu protilátek proti oběma antigenům, takže získáváme bivalentní hyperimunní sérum. Obsah protilátek odpovídá požadované normě na kvalitu hyperimunního séra proti psince a infekční hepatitidě psů.

Při testování řady různých vzorků čištěných a koncentrovaných imunních globulínů proti FCC a HCC se obsah protilátek rovněž pohybuje nad požadovanou normou stanovenou pro obchodní hyperimunní sérum homologní i po přepočtu koncentrace imunních složek na pětinasobek (viz tabulku II), třebaže bylo v řadě případů použito větší množství viru k neutralizaci.

V dalších pokusech jsme opakovaně vyšetřili průměrný vzorek imunních globulínů v NT na HCC při použití různých dávek viru k neutralizaci. Ze získaných hodnot jsme vypočítali závislost titrů protilátek na množství viru použitého k neutralizaci (graf 3).

Jak je vidět z grafu 3, lze proložit získanými hodnotami přímku, jejíž rovnice je $y = 5,95 - 1,089 x$ a má regresní koeficient $b_{y/x} = -1,089$.

II. Titry několika vzorků čištěných a koncentrovaných imunních globulínů

Neutralizační test		1	2	3	4	5	6	7	8
FCC	Množství ID ₅₀ k neutralizaci	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	10 ^{3,5}	10 ^{3,7}
	Reciproké hodnoty ND ₅₀	415	572,5	380,5	396,7	640	640	5120	2560
HCC	Množství ID ₅₀ k neutralizaci	10 ³	10 ³	10 ³	10 ³	10 ⁴	10 ⁴	10 ⁶	10 ³
	Reciproké hodnoty ND ₅₀	3620	1810	1280	1810	905,2	452,5	285	538

Rovnoběžka vedená v bodě stanoveného limitu pro obchodní hyperimunní sérum v přepočtu na pětinasobnou koncentraci imunních složek dává možnost při testování imunních globulínů proti viru HCC použít jiného množství viru než je předepsáno v technických podmínkách, aby se dala určit jejich hodnota.

6. OVĚŘENÍ ÚČINNOSTI IMUNNÍCH GLOBULÍNŮ PROTI FCC A HCC U TERÉNNÍCH PŘÍPADŮ ONEMOCNĚNÍ

K ověření účinnosti imunních globulínů u nemocných zvířat jsme poskytli několik šarží přezkoušených na neškodnost a obsah neutralizačních protilátek několika veterinárním ošetrovám, stanicím klinické diagnostiky a terapie, veterinárním zařízením a veterinární službě jiných organizací (např. ozbrojených složek, velkochovu laboratorních zvířat apod.).

Z celé řady případů byl účinek imunních globulínů podrobně sledován na nemocných psech různého stáří s příznaky choroby psinkového komplexu. Téměř ve všech případech, kdy byly imunní globulíny použity v počátečním stádiu choroby, došlo k markantnímu zlepšení zdravotního stavu a k uzdravení. V případech, kdy byly imunní globulíny použity u klinicky rozvinuté choroby, docházelo jen k přechodnému zmírnění průběhu, ale stejně jako u použití hyperimunního séra v těchto případech ani imunní globulíny nejsou v této fázi rozvinutého průběhu psinky nebo infekční hepatitidy psů schopny úplně likvidovat nákazu.

Ve srovnání s účinkem hyperimunního séra proti FCC a HCC se mnohdy jevil účinek imunních globulínů výrazněji. Dále bylo v terénní praxi velmi uvítáno snížení imunizační dávky proti hyperimunnímu séru na pětinu objemu, což představuje např. zmenšení dávky pro dospělého psa z 50,0 ml na pouhých 10,0 při zachování stejného imunizačního účinku.

DISKUSE

Kombinovaná imunizace koně proti FCC a HCC imunizačními schémata podle Mackowiaka a spol. (1959), Nicola a spol. (1959) a dále podle Popescu a spol. (1962) souběžně dala kladné výsledky. Po hyperimunizaci došlo k tvorbě protilátek proti oběma antigenům současně a lze tedy říci, že oba virové antigeny nepůsobí navzájem rušivě v jejich imunogenním účinku na organismus koně.

Obsah neutralizačních protilátek séra zůstává po jeho purifikaci na globulínové frakce a dále po lyofilizaci a koncentraci nad požadovanými hodnotami.

Čistota globulinových frakcí je podle elektroforetického hodnocení dostatečná a zaručuje bezpečnou neškodnost imunních globulínů, kde ani po opakované aplikaci mnohonásobku uvažované dávky nedochází k lokálním či celkovým anafylaktickým reakcím u očkovaných zvířat.

Terapeutická aktivita imunních globulínů byla sledována a zkoušena i za terénních podmínek veterinární službou a dala řadu kladných výsledků. Avšak stejně jako u hyperimunního séra i zde záleží na tom, v jaké fázi onemocnění budou použity. Máme za to, že pětikrát nižší dávka než je předepsána u hyperimunního séra proti FCC a HCC (tj. snížení imunizační dávky o 80 %) při použití protilátek zbavených většiny balastních bílkovinných složek působí na organismus atakovaný infekcí FCC nebo HCC bez většího nežádoucího zatížení RES.

Minimální přípustný obsah neutralizačních protilátek proti FCC a HCC byl převzat z limitu pro homologní hyperimunní sérum proti FCC a HCC v přepočtu na pětinásobnou koncentraci. V číselném vyjádření představuje tento limit požadavek, aby 1,0 ml imunních globulínů neutralizoval nejméně $2,5 \times 10^5$ ID₅₀ viru HCC a stejné množství viru FCC.

Pro snadnější testování aktivity imunních globulínů v NT na HCC byl vypracován vztah mezi titrem protilátek a množstvím použitého viru HCC pro neutralizaci. Podle tohoto vztahu (viz regresní přímka) lze pro testování imunních globulínů proti viru HCC použít i jiného množství viru, než je předepsáno, aby se dala určit jejich hodnota vzhledem ke stanovenému minimálnímu limitu.

Úspěšná příprava imunních globulínů pro pasivní imunizaci psů a košovinových zvířat proti FCC a HCC z koňského hyperimunního séra, zpracování způsobu přípravy a koncentrace a dále vyhovující výsledky testů neškodnosti a účinnosti dávají předpoklad pro využití uvedeného postupu pro velkoprodukci tohoto preparátu.

Možnost dlouhodobého využití koně jako dárce krve při stálém udržování hladiny protilátek na žádané výši podstatně zvyšuje stávající ekonomický efekt této výroby.

Došlo dne 6. 11. 1967

Technická spolupráce: Ivana Štrosová, Marie Krámerová, Jan Krámer.

Literatura

1. HAIG D. A.: Canine distemper immunization with avianised virus. = „Onderstepoort J. Vet. Res.“ 27 : 19-53, 1956.
2. JIRAN E.: Infekční zánět jater psů (Rubarth). Izolace a kultivace viru. = „Vet. Med.“ 9 : 267-272, 1964.
3. JIRAN E.: Kultivace viru psinky na tkáňových kulturách. = „Vet. Med.“ 2 : 87-92, 1965.
4. JIRAN E.: K atenuaci viru infekční hepatitidy psů. = „Vet. Med.“ 11 : 215-223, 1966.
5. LARIN, N. M., HODGMAN S. F.: Gamma globulin prophylaxis of canine distemper. = „Vet. Rec.“ 66 : 549-550, 1954.
6. MACKOWIAK C., FONTAINE J., GORET P.: Préparation d'un sérum contre la maladie de Carré à partir du cheval. = „Bull. Acad. Vet. Fr.“ 32 : 391-395, 1959.
7. NICOL L., GIRARD O., CORVAZIER R., CHEYROUX M., RECLARD P., SI-ZARET Ph.: Sérums équins anti-virus de Carré. Production - Titrage et Utilisation. = „Bull. Acad. Vet. Fr.“ 32 : 379-390, 1959.

8. PANKOV V. A.: Opyt polučeniya gyperimmunnoj syvorotky protiv čumy sobak ot lošadi. = „Veterinarija“ 30 : 16-19, 1953.
9. POPESCU Ar., CONSTANTINESCU C., TICAN V., CONSTANTINESCU Cr., MĂNOIU I., PĂTRĂȘCANU I., TOTORCEA N.: Prepararea serului contra hepatitei contagioase canine, pe ciine și pe cal. = „Lucrarile stiintifice. inst. deser. vas. Pasteur-Bucuresti“ VI : 155-162, 1962.
10. REED L. J., MUENCH H.: A simple method of estimating fifty per cent end-point. = „Am. J. Hyg.“ 27 : 493-497, 1938.
11. YEU F., RECULARD P.: Détoxication et purification du sérum anti-virus de Carré équin obtenu par injection d'organes virulents du furet. = „Ann. Inst. Past.“ 96 : 333-342, 1959.

ЙИРАН Е., ПЕТР Г., УРБАНЕК З. (Биовета, Терезин). Подготовка иммунных глобулинов против чумы собак и инфекционного гепатита собак. Вет. мед. (Прага) 13 (7) : 423-430, 1968.

Произвели параллельно успешную иммунизацию лошади против чумы собак и против инфекционного гепатита собак. В работе описывают способ подготовки и концентрации иммунных глобулинов, тесты безвредности и оценку их активности в нейтрализационных тестах. Концентрация иммунных глобулинов позволяет понижение иммунизационной дозы по сравнению с гипериммунной сывороткой до 20 % первоначального объема. Проверка иммунных глобулинов на практике показала положительные результаты.

параллельная иммунизация лошади вирусом чумы собак и вирусом инфекционного гепатита собак; подготовка лошадиных сывороточных глобулинов; оценка активности иммунных глобулинов.

JIRAN, E., PETR, G., URBÁNEK, Z. (Bioveta, Terezín), *On the Preparation of Immune Globulins against Distemper and Infections Hepatitis of Dogs*. Vet. Med. (Praha) 13 (7) : 423—430, 1968.

A successful immunization of a horse against distemper and infectious hepatitis of dogs was carried out parallelly. There is a description of the method of preparation and concentration of immune globulins, of their testing for harmlessness, and an evaluation of their activity in neutralization tests. Concentration of immune globulins makes possible a lowering of the immunization dose, compared with hyperimmune serum, to 20 per cent of the original volume. A field checking of immune globulins produced positive results.

Parallel immunization of a horse with the virus of distemper and with the virus of infectious hepatitis of dogs; preparation of horse serum globulins; evaluations of the activity of immune globulins.

JIRAN, E., PETR, G., URBÁNEK, Z. (Bioveta, Terezín). *Zur Herstellung der immunen Globuline gegen Hundestaupe und infektiöse Hepatitis der Hunde*. Vet. Med. (Praha) 13 (7) : 423—430, 1968.

Es wurde eine erfolgreiche Immunisierung des Pferdes parallel gegen Hundestaupe und infektiöse Hepatitis durchgeführt. Es werden auch die Weise der Vorbereitung und Konzentration der immunen Globuline, Prüfungen der Unschädlichkeit und Bewertung ihrer Aktivität in Neutralisierungstesten beschrieben. Die Konzentration der immunen Globuline ermöglicht die Herabsetzung der Immunisierungsdose gegenüber dem hyperimmunen Serum auf 20% des ursprünglichen Volumens. Die Überprüfungen der immunen Globuline in Terrainpraxis brachte positive Ergebnisse. die parallele Immunisierung des Pferdes mit dem Virus der Hundestaupe und der infektiösen Hepatitis der Hunde; Herstellung der Serumglobulins von Pferden; Bewertung der Aktivität der immunen Globuline.

Adresy autorů:

MVDr. Eduard Jiran CSc., RNDr. Gustav Petr, Bioveta n. p., Terezín, MVDr. Zdeněk Urbánek, t. č. Dokumentační středisko, VŠZ, veter. fak., Brno

VLIV ACTH, STH A NORADREALINU NA HLADINU NEMK, GLUKÓZY A KETOLÁTEK V KRVÍ KOZ

J. Škarda, S. Bartoš, F. Doležel

ČSAV, Laboratoř fyziologie a genetiky živočichů, Uhřetěves

ŠKARDA, J., BARTOŠ, S., DOLEŽEL, F. *Vliv ACTH, STH a noradrenalinu na hladinu NEMK, glukózy a ketolátek v krvi koz.* Vet. Med. (Praha) 13 (7): 431—436, 1968.

Hladina NEMK byla výrazně zvýšena intramuskulárním injikováním STH a intravenózním podáním noradrenalinu. Nevýznamně se zvyšovala intramuskulárním injikováním ACTH. Vzestup hladiny glukózy po podání ACTH a STH byl statisticky významný. Mechanismus působení těchto hormonů je připisován jejich účinku na sekreci glukokortikoidů, které jednak inhibují utilizaci glukózy a jednak zvyšují glukoneogenezu z bílkovin. Noradrenalin prudce zvyšuje hladinu glukózy v krvi svým glykogenolytickým účinkem. Statisticky významný vzestup byl zaznamenán již 15 min. po podání. Vlivem somatotropního hormonu došlo k vzestupu hladiny ketolátek. Hlavními hormonálními faktory, které řídí utilizaci tuku podle metabolických potřeb organismu jsou STH a inzulin, kdežto noradrenalin je pouze faktor nezbytný pro rychlou odpověď organismu na vlivy okolního prostředí.

prežvýkavci; mobilizace mastných kyselin; metabolismus tukové tkáně; vliv hormonů.

Studium účinku hormonů na hladinu neesterifikovaných mastných kyselin (NEMK) u prežvýkavců začal Annison (1960) na ovcích. Ve své práci demonstroval účinek inzulinu. Účinek růstového hormonu uvádějí Williams a kol. v r. 1963 u dojnic a Wheatley a kol. (1966) u ovcí. Vliv inzulinu a adrenalinu na hladinu NEMK normálních dojnic a dojnic s ketózou sledoval Kronfeld (1965 a). Velmi rozsáhlou práci publikovali Radloff a Schultz (1966), kteří sledovali kromě účinku STH a inzulinu ještě účinek ACTH, glukokortikoidů, glukagonu, adrenalinu a noradrenalinu u samců a samic koz. Vliv adrenalinu na hladinu NEMK u ovcí sledovali Zeleňák a Kóňa (1966). Ovlivnění hladiny NEMK u dojnic po podání laktogenního hormonu studovali Williams a kol. (1966).

V naší práci jsme sledovali koncentraci NEMK, glukózy a ketolátek po podání ACTH, STH a noradrenalinu.

MATERIÁL A METODIKA

Zvířata. K pokusu byly použity 4 dospělé kozy — kříženci, které byly krmeny 14 dní před začátkem pokusu a po celé experimentální období 0,5 kg ječného šrotu a senem *ad libitum*. Zvířata byla použita k pokusu po 48 hod. hladovění. Den před pokusem byla zavedena polyethylenová kanyla o průměru 2 mm a fixována Michlovou svorkou.

Aplikované hormony byly použity v těchto dávkách *pro toto*:

Noradrenalin — 1 mg i. v.

Corticotropin Spofa 100 m. j. i. m.

Somatotropin Spofa — 200 Evansových j. i. m.

Nulový vzorek krve byl odebrán před podáním hormonu. Po aplikaci noradrenalinu byly vzorky odebírány ve čtvrt hodinových intervalech po dobu 1 hodiny, po aplikaci ostatních hormonů 1., 3., 5., 7. a 9. hod. Jako kontrola sloužily vzorky krve odebrané po intramuskulární nebo intravenózní injekci fyziologického roztoku.

Proti srážení odebraných vzorků krve bylo užito směsi šťavelanů, — (10% roztok šťavelanu draselného a amonného — 2:3 — v množství 1 ml činidla na 50 ml krve). Potřebné množství roztoku bylo napipetováno do vzorkovnic a odpařeno do sucha při 80 °C.

Chemické metody. Vzorky krve byly centrifugovány a v získané krevní plazmě stanovovány:

glukóza — anthronovou reakcí podle Glicka (1961),

ketolátky — metodou podle Brittona (1966),

NEMK — metodou Doleho modifikovanou podle Kronfelda (1965 a).

Vliv ACTH na hladinu NEMK v krvi se nejvýrazněji projevil 5. hod. po aplikaci, kdy koncentrace NEMK vzrostla na 564 /uekv/l ze 455/uekv/l v čase 0 (vzestup však není statisticky významný). V 9. hod. po injekci vzrostla koncentrace ketolátek z 1,8 na 2,4 mg% (vzestup statisticky nevýznamný) a glukózy z 86 na 127 mg% (vzestup statisticky významný na hladině $P < 0,01$).

Po injekci STH se zvýšila koncentrace NEMK v krvi z 309 na 850/uekv/l v 7. hod. Tento vzestup byl průkazný na hladině $P < 0,05$. Vzrůst hladiny ketolátek v 9. hod. po infúzi z 1,4 na 3,4 mg% byl vysoce statisticky průkazný ($P < 0,01$). Zvýšení koncentrace glukózy z 83 na 115 mg% bylo průkazné pouze pro hladinu $P < 0,10$.

Noradrenalin způsobil okamžité zvýšení všech sledovaných hodnot. Již v 15. min po infúzi byl zjištěn statisticky průkazný vzestup NEMK z 385 na 596 /uekv/l a glukózy z 94 na 161 mg% (hladina průkaznosti $P < 0,05$) a statisticky neprůkazné zvýšení ketolátek z 1,4 na 1,5 mg%.

Všechna data jsou uvedena v tabulce I.

DISKUSE

Účinek ACTH *in vivo* na hladinu NEMK studovala řada autorů (White a Engel, 1959; Wertheimer a Shafir, 1960; Hollenberg a kol., 1961; Smith a kol. 1962; Librik a Clayton, 1963), přičemž výsledky, které zaznamenali, byly značně rozdílné. Někteří autoři zaznamenali vzestup NEMK, jiní jej nezaznamenali. U koz sledovali hladinu NEMK po podání ACTH Radloff a Schultz (1966). Zaznamenali průkazný vzestup koncentrace NEMK v plazmě samic, kdežto u kastrátů samců průkazný rozdíl nezjistili. V našich pokusech na samicích koz jsme zaznamenali neprůkazný vzestup NEMK. Prokázali jsme však významný vzestup hladiny glukózy. Mechanismus tohoto procesu můžeme vysvětlit na základě činnosti systému ACTH — kůra nadledvin. Glukokortikoidy inhibují fosforylaci, vychytávání a utilizaci glukózy. Snižují citlivost organismu k hypoglykemickému působení inzulínu. Inhibují oxidativní dekarboxylaci kyseliny pyrohroznové, což vede k bloádě a hromadění intermediárních metabolitů glykolytické cesty. Kromě toho hormony kůry nadledvin stimulují katabolismus bílkovin a glukogenní aminokyseliny jsou pak v játrech a ledvinách použity k syntéze glukózy a glykogenů. Vznikající hyperglykémie je tedy výsledkem kombinovaného účinku

I. Změny krevních složek v různou dobu po podání hormonů

Čas	NEMK uekv/1	Odchyl- ka†)	Ketolátky mg %	Odchyl- ka†)	Glukóza mg %	Odchyl- ka†)
hod.	ACTH					
0	455 ± 113	—	1,8 ± 0,12	—	86 ± 8	—
1	330 ± 77	—125	1,1 ± 0,11	— 0,7	135 ± 19	+ 49
3	463 ± 68	+ 8	1,5 ± 0,21	— 0,3	140 ± 22	+ 54
5	564 ± 149	+117	1,9 ± 0,16	+ 0,1	140 ± 21	+ 54
7	465 ± 121	+ 10	1,9 ± 0,19	+ 0,1	139 ± 21	+ 53
9	472 ± 124	+ 17	2,4 ± 0,42	+ 0,6	127 ± 14**)	+ 41
Součet odchylek		+ 27		— 0,2		+251
hod.	STH					
0	308 ± 67	—	1,4 ± 0,07	—	83 ± 8	—
1	288 ± 43	— 20	1,2 ± 0,18	— 0,2	102 ± 19	+ 19
3	416 ± 88	+107	1,9 ± 0,18	+ 0,5	91 ± 15	+ 8
5	665 ± 139	+356	3,2 ± 0,12	+ 1,8	84 ± 7	+ 1
7	850 ± 215*)	+541	3,3 ± 0,22	+ 1,9	103 ± 15	+ 20
9	765 ± 209	+456	3,4 ± 0,16**)	+ 2,0	115 ± 6	+ 32
Součet odchylek		+1440		+ 6,1		+ 80
min.	NORADRE- NALIN					
0	385 ± 157	—	1,4 ± 0,12	—	94 ± 11	—
15	596 ± 208*)	+211	1,5 ± 0,27	+ 0,1	161 ± 23*)	+ 67
30	442 ± 197	+ 57	1,3 ± 0,44	— 0,1	157 ± 21	+ 63
45	433 ± 186	+ 48	1,3 ± 0,46	— 0,1	153 ± 21	+ 59
60	377 ± 156	— 8	1,3 ± 0,44	— 0,1	150 ± 19	+ 56
Součet odchylek		+ 308		— 0,2		+245
hod.	Kontrola					
0	500 ± 42	—	1,6 ± 0,3	—	64 ± 5	—
1	535 ± 200	+ 35	1,9 ± 0,4	+ 0,3	68 ± 9	+ 4
3	444 ± 118	— 56	2,1 ± 0,4	+ 0,5	70 ± 5	+ 6
5	525 ± 158	+ 25	2,1 ± 0,4	+ 0,5	73 ± 8	+ 9
7	455 ± 113	— 45	1,9 ± 0,2	+ 0,3	72 ± 12	+ 8
9	— —	—	2,0 ± 0,3	+ 0,4	76 ± 12	+ 12
Součet odchylek		— 41		+ 2,0		+ 39

†) Odchylka od nulové hodnoty

*) P < 0,05

**) P < 0,01

zvýšené produkce a snížené rychlosti vychytávání glukózy (Ashmore a kol., 1956; Frawley a Shelley, 1961).

Počáteční pokles hladiny NEMK v 1. hod. po injekci STH by v našem pokusu vystřídán postupným zvyšováním koncentrace NEMK, která dosáhla maxima v 7. hod. po aplikaci. Počáteční pokles, případně zdržení mobilizace mastných kyselin, je důsledkem iniciální fáze působení STH, kdy současně dochází jak ke stimulaci lipolýzy (vlivem STH), tak resyntézy glyceridů — jako snaha organismu nastolit opět fyziologickou homeostázu v tukové tkáni (Cahill a kol., 1960; Hamid a kol., 1963). Růstový hormon snižuje tvorbu mastných kyselin z acetyl KoA, zároveň však není zvýšena oxidace tohoto intermediárního metabolitu k CO_2 , takže zbývá jediná možnost, a to kondenzace a konverze k acetoacetyl KoA a pak ke ketolátkám v játrech (Stadie, 1958; Kronfeld, 1965b). Tvorbou ketolátek, které jsou snadno vychytávány ve všech extrahepatických tkáních jako zdroj energie, bezprostřední vliv STH na lipidový metabolismus končí. Hladina ketolátek vlivem STH v našem pokusu rostla se zpožděním za růstem hladiny NEMK. Maximální hladiny bylo dosaženo ke konci pokusu, v 9. hod. po aplikaci hormonu. Po podání STH jsme zaznamenali postupné zvyšování glykémie, které je výsledkem glukostatického účinku STH. Vlivem STH dochází k poklesu vychytávání glukózy ve svalech a jiných tkáních, k blokádě jejího využití a zároveň ke zvýšení její produkce a v důsledku toho ke zvýšení glykémie.

Na noradrenalin a příbuzné aminy se v současné době díváme jako na faktory nezbytné pro rychlou odpověď organismu na stressové podmínky. Jejich účinek závisí na funkci nadledvin (Shafir a Steinberg, 1960) a štítné žlázy (Debons a Schwartz, 1961). Účinek na hladinu NEMK je téměř okamžitý a je do značné míry nezávislý na hladině glukózy nebo inzulínu (Buckle a kol., 1961). Na našich pokusných zvířatech jsme zaznamenali nejvyšší hladinu NEMK a glukózy již 15 min. po injekci noradrenalinu.

Došlo dne 2. 6. 1967

Literatura

1. ANNISON, E. F.: Plasma non-esterified fatty acids in sheep. = „Journal of Agricultural Research“, 11, 1960: 58-64.
2. ASHMORE, J. - HASTINGS, A. B. - NESBETT, F. B. - RENOLD, A. B.: Studies on carbohydrate metabolism in rat liver slices. VI. Hormonal factors influencing glucose-6-phosphatase. = „Journal of Biological Chemistry“, 218, 1956: 88-78.
3. BRITTON, H. G.: The chemical estimation of ketone bodies. = „Analytical Biochemistry“, 15, 1966: 261-269.
4. BUCKLE, R. M. - RUBINSTEIN, D. - MCGARRY, E. E. - BECK, J. C.: Factors influencing the release of free fatty acids from rat adipose tissue. = „Endocrinology“, 69, 1961: 1009-1015.
5. CAHILL, G. H. - LEBOEUF, B. - RENOLD, A. E.: Factors concerned with the regulation of fatty acid metabolism by adipose tissue. = „American Journal of Clinical Nutrition“, 8, 1960: 733-739.
6. CIARANFI, E. - FONNESU, A.: Time-course of injected acetate in normal and depancreatized dogs. = „Biochemical Journal“, 57, 1954: 171-175.
7. DEBONS, A. F. - SCHWARTZ, I. L.: Dependence of the lipolytic action of epinephrine in vitro upon thyroid hormone. = „Journal of Lipid Research“, 2, 1961: 86-89.
8. FRAWLEY, T. F. - SHELLEY, T. F.: Effects of anti-inflammatory steroids on

- carbohydrate metabolism. In: Mayer, J. H. - Fuchs, M. - Hahneman symposium of inflammation and disease of connective tissues. Pathogenesis and therapy. W. B. Saunders, Philadelphia, 1961: 360.
9. GLICK, D. (ed.): Methods of biochemical analysis. Vol. II. Interscience Publishers, New York — London, 3rd ed. 1961.
 10. HAMID, M. A. - RUBINSTEIN, D. - BECK, J. C.: Effect of prolactin and growth hormone on glucose metabolism by adipose tissue. = „Clinical Research“, 11, 1963: 405.
 11. HOLLENBERG, C. H. - RABEN, M. S. - ASTWOOD, E. B.: The lipolytic response to corticotropin. = „Endocrinology“, 68, 1961: 589-596.
 12. KRONFELD, D. S.: Plasma dairy non-esterified fatty acid concentrations in the cow: Responses to nutritional and hormonal stimuli, and significance in ketosis. „Veterinary Record“, 77, 1965a: 30-34.
 13. KRONFELD, D. S.: Growth-hormone-induced ketosis in the cow. = „Journal of Dairy Science“, 48, 1965b: 342-346.
 14. LIBRIK, L. - CLAYTON, G. W.: The measurement of plasma nonesterified fatty acid levels following ACTH release in man. = „Metabolism“, 12, 1963: 790-791.
 15. RADLOFF, H. D. - SCHULTZ, L. H.: Hormonal regulation of plasma free fatty acid concentration in ruminants. = „Journal of Dairy Science“, 49, 1966: 971-975.
 16. SHAFRIR, E. - STEINBERG, D.: The essential role of the adrenal cortex in the response of plasma free fatty acid, cholesterol and phospholipids to epinephrine injection. = „Journal of Clinical Investigation“, 39, 1960: 310-319.
 17. SMITH, R. L. - PAOLETTI, R. - BRODIE, B. B.: The essential role of noradrenaline in corticotrophin-induced fatty acid mobilization. = „Biochemical Journal“, 84, 1962: 51P-52P.
 18. STADIE, W. C.: Fat and diabetes: Ketogenesis. = „Diabetes“, 7, 1958: 173-180.
 19. WERTHEIMER, E. - SHAFRIR, E.: Influence of hormones on adipose tissue as a center of fat metabolism. = „Recent Program of Hormone Research“, 16, 1960: 467-495.
 20. WHEATLEY, I. S. - WALLACE, A. L. C. - BASSETT, J. M.: Metabolic effects of ovine growth hormone in sheep. = „Journal of Endocrinology“, 35, 1966: 341-353.
 21. WHITE, J. E. - ENGEL, F. L.: Fat mobilization by purified corticotrophin in the mouse. = „Proceedings of Society of Experimental Biology“ (N. Y.), 102, 1959: 272-274.
 22. WILLIAMS, W. F. - LEE, S. D. - HEAD, H. H. - LYNCH, J.: Growth hormone effects on bovine blood plasma fatty acid concentration and metabolism. = „Journal of Dairy Science“, 46, 1963: 1405.
 23. WILLIAMS, W. F. - WENSSEAR, A. G. - LAUTERBACH, G. E.: Lactogenic hormone effects on plasma nonesterified fatty acids and blood glucose concentrations. = „Journal of Dairy Science“, 49, 1966: 106-107.
 24. ZELENÁK, I. - KÓŇA, E.: Utilizácia octanu a jeho vplyv na NEMK a acetónové látky v krvi u oviec, kŕmených rozličnými diétami. = „Československá fyziologie“, 15, 1966: 393.

ШКАРДА Й., БАРТОШ С., ДОЛЕЖЕЛ Ф. (Лаборатория физиологии и генетики животных, ЧСАН, Угржинева, Чехословакия). Влияние АСТН, СТН и норадреналина на уровень неэтерифицированных жирных кислот, глюкозы и кетоновых веществ в крови коз. Вет. мед. (Прага) 13 (7): 431-436, 1968.

Уровень неэтерифицированных жирных кислот сильно повысился в результате внутримышечного введения СТН и внутривенного введения норадреналина. Его повышение было слабым при внутримышечном введении АСТН. Повышение уровня глюкозы после введения АСТН и СТН было статистически значимым. Механизм действия этих гормонов приписывается их воздействию на секрецию глюкокортикоидов, которые, с одной стороны, замедляют использование глюкозы, а с другой, повышают глюконеогенез из белков. Норадреналин сильно повышает уровень глюкозы в крови своим глюконеогенетическим действием. Статистически значимое повышение было отмечено уже спустя 15 мин. после введения. Уровень кетоновых веществ повышался под влиянием соматотропного гормона. Основные гормональные факторы, регулирующие использование жира согласно метаболическим потребностям организма, — это СТН и инсулин, тогда как норадреналин — лишь фактор, необходимый для быстрой реакции организма на влияния окружающей среды.

Ключевые: мобилизация жирных кислот; метаболизм жировой ткани; влияние гормонов.

ŠKARDA, J., BARTOŠ, S., DOLEŽEL, F. (Laboratory of Physiology and Genetics of Animals, Czechoslovak Academy of Sciences, Uhřetěves, Czechoslovakia). *The Influence of ACTH, STH, and of Noradrenalin on the Level of NEFA, Glucose, and Keto-Substances in the Blood of Goats*. Vet. Med. (Prague) 13 (7) : 431—436, 1968. The NEFA level was increased significantly by an intramuscular injecting of STH and by an intravenous administration of noradrenalin. It was increased insignificantly by an intramuscular injection of ACTH. The rising of the glucose level after an administration of ACTH and STH was statistically significant. The mechanism of the acting of these hormones has been ascribed to their effect on the secretion of glucocorticoids, which, on the one hand, inhibit the utilization of glucose, and, on the other hand, raise the glucose level in the blood because of their glycogenolytic effect. A statistically significant rising was recorded already 15 minutes after administration. Influenced by the somatotrophic hormone there occurred a rising of the keto-substance level. The chief hormonal factor controlling the conversion of fats according to the metabolic demands of the organism are STH and insulin, whereas noradrenalin is only a factor essential for a rapid response of the organism to the influences of the surrounding milieu.

ruminants; mobilization of fatty acids; metabolism of the adipose tissue; influence of hormones.

ŠKARDA, J. - BARTOŠ, S. - DOLEŽEL, F. (Laboratorium für Physiologie und Genetik der Tiere ČSAV, Uhřetěves, Tschechoslowakei). *Einfluß des ACTH, STH und Noradrenalins auf den Gehalt des Ziegenblutes an nichtesterifizierten Fettsäuren (NEFS), Glukose und Ketonstoffen*. Vet. Med. (Praha) 13 (7) : 431—436, 1968.

Der NEFS-Spiegel wurde durch intramuskuläre STH-Injektion und intravenöse Verabreichung des Noradrenalins wesentlich erhöht. Nach intramuskulärer ACTH-Injektion erhöhte er sich nur unsignifikant. Die Erhöhung des Glukosespiegels nach Verabreichung des ACTH und STH war statistisch signifikant. Der Wirkungsmechanismus dieser Hormone wird ihrem Einfluß auf die Sekretion der Glukokortikoide zugeschrieben, welche einerseits die Glukoseutilisierung inhibieren und andererseits die Glukoneogenese aus Eiweiß erhöhen. Das Noradrenalin erhöht wesentlich den Glukosespiegel des Blutes durch seine glykogenolytische Wirkung. Eine statistisch signifikante Erhöhung wurde bereits in 15 Minuten nach Verabreichung verzeichnet. Durch Einfluß des somatotropen Hormons kam es zu einer Erhöhung des Ketonstoffespiegels. Die hauptsächlichsten Hormonfaktoren, welche die Utilisierung des Fettes je nach den metabolischen Bedürfnissen des Organismus regeln, sind STH und Insulin, während das Noradrenalin einen nur für die schnelle Reaktion des Organismus auf die Einflüsse der Umwelt unerläßlichen Faktor darstellt.

Wiederkäuer; Mobilisation der Fettsäuren; Metabolismus des Fettgewebes; Einfluß der Hormone.

Adresa autorů:

MVDr. Josef Škarda, Ing. Stanislav Bartoš, CSc., MVDr. František Doležel, ČSAV, Laboratoř fyziologie a genetiky živočichů, Uhřetěves
Vedoucí pracoviště: Doc. dr. J. Bílek, DrSc.

MECHANISMUS VZNIKU REZISTENCE NA PENICILIN U *Bacillus anthracis* PO ŘÍZENÉ ADAPTACI

K. Prokůpek

Státní veterinární ústav, Národní referenční laboratoř pro antrax, Gottwaldov

PROKŮPEK, K. *Mechanismus vzniku rezistence na penicilin u Bacillus anthracis po řízené adaptaci*. Vet. Med. Praha) 13 (7) : 437—446, 1968.

Experimentálně se podařilo dosáhnout replikovou metodou u všech 20 testovaných antraxových kmenů určitého stupně rezistence na penicilin. V procesu takto vyvolané rezistence se projevil u bakteriálních kmenů dvojí základní typ. První typ se vyznačoval vysokou penicilinázovou aktivitou a bujným růstem na testovací půdě. Tento penicilinázový typ byl dokladem toho, že penicilináza se podílí na vzniku rezistentních kmenů. Druhý typ, který byl častější, se projevoval nezvýšenou produkcí penicilinázy. V prvních pasážích se vyznačoval zpravidla značně omezeným růstem a nedosahoval té výšky rezistence jako typ první. Zdá se, že podstata tohoto typu rezistence není založena na exogenně produkované penicilináze. Jedná se pravděpodobně o stav vnitřní rezistence ve smyslu Jacob-Monodovy teorie o genetickém řízení proteosyntézy. Kombinací obou základních typů byl typ smíšený. Trvání penicilinové rezistence je podmíněné. Po jednoročním období vegetačního klidu ztratil jen jeden kmen svou získanou rezistenci. U ostatních kmenů došlo ke snížení rezistence v různém stupni. Ukázalo se, že původně penicilinázová rezistence se u většiny kmenů změnila ve vnitřní formu rezistence.

Bacillus anthracis; G-penicilin; penicilináza; rezistence; penicilinázová aktivita; vnitřní typ rezistence; trvání penicilinové rezistence; penicilinázový typ rezistence; smíšený typ rezistence.

Od objevení fermentu penicilinázy (A b r a h a m a C h a i n, 1940) stal se problém vztahů mezi rezistencí na penicilin a tvorbou penicilinázy předmětem četných studií. Logicky se všeobecně očekávalo, že u mikrobů citlivých na penicilin bude existovat přímý vztah mezi rezistencí a penicilinázovou aktivitou. Ukázalo se však, že některé mikrobiální druhy, rezistentní k penicilinu, penicilinázu neprodukuje. Uvádí se, že přímý vztah mezi produkcí penicilinázy a stupněm rezistence na penicilin se neprokázal. Z uvedeného vyplývá, že problém vztahů mezi rezistencí na penicilin a produkcí penicilinázy vyžaduje ještě dalšího studia.

Otázkou rezistence antraxových kmenů na penicilin zabývali se z našich pracovníků H a r n a c h a s p o l. (1959). Pracovali v adaptačních pokusech se dvěma kmeny. Z počátku jen zcela malý počet jedinců byl schopen adaptace na živné prostředí s penicilinem. Dalšími pasážemi se rezistence zvyšovala, až bylo postupně dosaženo 500 j/ml. Původní R-fáze se změnila v RS a později v S-fázi. Autoři se domnívají, že podstatou vzniku adaptační rezistence je zvýšená produkce penicilinázy, ale nijak to neprokazují. Během dvou měsíců vegetačního klidu poklesla takto získaná rezistence opět na původní hranici (0,5 j/ml). Autoři zdůrazňují, že schopnost adaptace některých antraxových kmenů k vyšším dávkám penicilinu je značná. V adaptačních pokusech postupovali autoři tak, že na maso-peptonový agar s příslušnou koncentrací penicilinu nanесли stanovenou dávku sporové suspenze *Bac. anthracis*, obsahující 10 000 spor. Než bylo dosaženo maximální hranice rezistence (500 j/ml) bylo třeba asi 70 pasáží. Reverzní ztráta rezistence byla kontrolována biologickým pokusem na bílých myších.

Ve své další práci zabývali se Harnach, Mesároš a Pleva (1960) obdobnou tematikou, a to rezistencí terénních antraxových kmenů k penicilinu, streptomycinu a aureomycinu po spontánní a řízené adaptaci. Autoři tak navázali na svou předchozí práci (1959), ve které prokázali snadnou adaptační schopnost antraxových kmenů. Adaptací na stupňované dávky penicilinu se podařilo dosáhnout relativně vysokého stupně rezistence, a to u 50 kmenů v rozsahu 1—9j PNC/ml, u 13 kmenů od 10 do 250j PNC/ml a u 3 kmenů dokonce až na 5000j PNC/ml.

Významná je práce rumunských autorů Horodniceanu a Sasarmana (1961) o vztazích mezi aktivitou v produkci penicilinázy a rezistencí antraxových kmenů. Autorům se nepodařilo prokázat vzájemný vztah. Vycházejíce z výsledků své práce, vyslovili autoři zajímavou hypotézu o funkci penicilinázy. Domnívají se, že penicilináza představuje obranný prostředek bakterií, produkovaný za přírodních podmínek proti malému množství penicilinu, vytvářeného různými plísněmi. Malé dávky penicilinu, se kterými se můžeme v přírodě setkat, dovolují selekci bakteriálních buněk, produkujících penicilinázu, z populací velmi citlivých na penicilin, jako je např. *Bac. anthracis*. To znamená, že malé dávky penicilinu zůstávají neúčinné v přítomnosti producentů penicilinázy. Rezistence proti vysokým dávkám antibiotika bude, podle názorů autorů, založena asi na jiném mechanismu.

Eagle (1954) na podkladě výsledků svých pokusů poukazuje na skutečnost, že při nejmenším existují tři mechanismy vzniku penicilinové rezistence. Rada bakterií odbourává penicilin vyprodukovanou penicilinázou. Některé kmeny sice neuvolňují penicilinázu do média, ale rychle odbourávají penicilin, jakmile vnikne do buňky. Snad nejdůležitějším činitelem penicilinové rezistence u bakterií zdá se být jejich variabilní schopnost vázat se s antibiotikem. Mezi bakteriemi, které se vyznačují penicilinázovou aktivitou, projevují se rezistentní varianty obvykle tak, že vážou za daných podmínek méně penicilinu než původně citlivé kmeny. Vyskytují se však také případy, kdy rezistentní varianty normálně citlivých populací mohou se vázat s penicilinem ve stejném stupni jako původně citlivé buňky, aniž by byly usmrceny.

MATERIÁL A METODIKA

K pokusům s penicilinorezistencí jsme vybrali 20 dobře definovaných antraxových kmenů naší sbírky. Čistota vybraných kmenů byla zkontrolována před zahájením a v průběhu prací metodou kultivace z jedné spory.

Použili jsme masopeptonového bujonu a masopeptonového agaru standardního složení (pH 7,4), 20% krevního agaru (beraní krev). Testovací půdou byl 20% krevní agar s příslušným přídatkem antibiotika. Za antibiotikum jsme zvolili draselnou sůl G — penicilinu. Antibiotikum bylo ředěno přímo do agaru a bylo přidáváno do testovací půdy v postupně zvyšovaných dávkách. Za počáteční dávku byla zvolena 1 jednotka. Při každé další pasáži byla dávka dále zvyšována řadou aritmetickou až do konečného stupně 20480j PNC/ml média. Koncentraci inokula jsme zjistili zákaloměrem a počet živých buněk kontrolně diluční plotnovou metodou.

V procesu experimentálně rozvíjené rezistence jsme použili dvě metody:

1. Metoda definovaného inokula za použití plotnové diluční metody (V ý m o l a a H e j z l a r, 1964),
2. Repliková metoda (L e d e r b e r g o v i, 1952).

Při první metodě jsme postupovali takto: Z 18hod. výchozí populace antraxového kmene na krevním agaru byla inokulována jedna izolovaná kolonie do masopeptonového bujonu a inkubována 3 hod. při 37 °C za aerobních podmínek. Abychom dosáhli populační homogenicity, byla kultura rozočkována na krevní agar tak, aby narostly izolované kolonie. Po 18hod. inkubaci při 37 °C jsme přenesli 10 jednotlivých kolonií do 5 ml masopeptonového bujonu a inkubovali 3 hod. při 37 °C. Homogenní rozptýlení populace v bujonu bylo do-

saženo šetrným roztřepáním kultury. Na testovací půdu bylo naneseno 0,1 ml bujonové kultury a inokulum bylo rozkličkováno po povrchu agarové vrstvy. Koncentrace inokula byla taková, že dávka 0,1 ml bakteriální suspenze obsahovala $1.10^7 - 5.10^7$ jedinců. Připravené inokulum se nanášelo na testovací půdu do 30 min. po skončení přípravy. Při replikové metodě bylo postupováno tak, že z 18hod. antraxové kultury na krevní agaru byla odebrána jedna izolovaná kolonie, roztřepána v 1 ml sterilního fyziologického roztoku a z něho kultivováno roztěrem na krevní agar tak, aby vznikl středně hustý porost izolovaných kolonií (asi 200 kolonií). Kultury byly inkubovány 3 hod. při 37 °C. Z takto narostlé půdy byla populace přenášena otiskem na testovací půdu. Replika (otisk) byla prováděna razítkem, opatřeným sametem o vysokém tuhém chlupu.

Všechny stupně dosažené rezistence byly pečlivě kontrolovány tak, že izolovaná kolonie populace, rostoucí na testovací půdě s určitou koncentrací penicilinu, byla přenesena do 5 ml masoseptonového bujonu a inkubována 3 hod. při 37 °C. Bujonová kultura šetrně roztřepána a množství 0,1 ml přeneseno na testovací půdu s touž a o jeden stupeň nižší koncentrací antibiotika a roztřeno po povrchu půdy. Pro každou koncentraci penicilinu použito nejméně dvou misek.

Současně s nastupující rezistencí byl sledován její vztah k penicilinázové aktivitě antraxových kmenů. Produkce exogenní penicilinázy byla stanovena metodou prokainpenicilinového testu (K ö r n l e i n, K o c h, 1954).

V Ý S L E D K Y

Dosažení stupně rezistence u 20 vybraných antraxových kmenů metodou definovaného inokula za použití plotnového dilučního testu je v přehledu uvedeno v tabulce I.

Jak z této tabulky vychází najevo, bylo touto metodou dosaženo rezistence na penicilin toliko u dvou kmenů. Stupeň dosažené rezistence byl vysoký. U ostatních testovaných kmenů nebylo dosaženo prakticky žádné rezistence. Tuto okolnost si nedovedu vysvětlit.

Penicilinázová aktivita byla sledována toliko u těchto dvou kmenů.

Rezistence dosažená metodou definovaného inokula byla v tomto případě u obou kmenů založena na zvýšené produkci penicilinázy a odpovídá penicilinázovému typu, dosaženému za použití replikové metody.

Diluční plotnová metoda nás neuspokojila, a proto jsme při dalších pokusech s penicilinorezistencí antraxových kmenů použili replikové metody. Výsledky experimentálně dosažené rezistence na penicilin u 20 antraxových kmenů, získané touto metodou, jsou uvedeny na přehledné tabulce II.

Z výsledků uvedených v této tabulce vyplývá, že u všech 20 antraxových kmenů bylo dosaženo určitého stupně rezistence. Dále je možno vyvodit, že při vytváření penicilinové rezistence lze u antraxových kmenů sledovat dva základní typy:

K prvnímu typu je možno zařadit kmeny, které se vyznačují výraznou penicilinázovou aktivitou. U těchto kmenů (Březnice, 289, AZV-41) jsme prokázali vysokou produkci penicilinázy téměř ve všech pasážích. Produkce penicilinázy se nezvyšuje postupně se zvyšující se dávkou penicilinu, ale může hned na počátku procesu rezistence vystoupit vysoko a udržovat se s určitým kolísáním přibližně na stejné úrovni. Klesající tendence se projevuje někdy na konci

I. Penicilinová rezistence antraxových kmenů pasážovaných metodou definovaného inokula

Kmen	Růst na penicilinové testovací půdě Počet jednotek PNC/ml média													
	1	5	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480
Březnice	***	*	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
289	***	***	*	*	***	*	***	***	***	***	***	*	*	–
AZV-41	***	***	*	*	***	***	***	***	***	***	***	*	*	*
AZV-6	***	*	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
AZV-19	***	*	*	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
4892	***	*	*	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
RK-194	***	*	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
17-IV/212	***	*	*	*	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–
150	***	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
5/58	***	*	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
107	***	*	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
103	***	*	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Pukl 1/56	***	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
726/1	***	*	*	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
835	***	*	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
3308	***	*	*	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
Trutnov	***	*	*	*	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–
86/5	***	*	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
460/55	***	*	*	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–
1549	***	*	*	*	*	–	–	–	–	–	–	–	–	–

Legenda: *** = silný růst, * = slabý růst až ojedinělé kolonie, – = úplná inhibice růstu

pasážované řady. Kmeny s takto se vyvíjející rezistencí se vyznačují dobrým růstem. Kmen AZV-41 po počáteční rozkolísanosti rozvíjel dále svou rezistenci na podkladě silné produkce penicilinázy. U některých kmenů už po první pasáži na testovací půdě (1j PNC/ml) je možno z vysoké produkce penicilinázy usuzovat na vysoký stupeň penicilinové rezistence. Dokladem toho je pokus s kmenem 289. S pasáží na 1j PNC/ml media byla provedena zkouška citlivosti na penicilin obvyklým způsobem. Výsledky ukazují, že už po pasáži na 1j PNC je v některých případech nástup penicilinové rezistence tak vysoký, že pasážovaný kmen ztrácí svou citlivost a roste na mediu s vysokým obsahem penicilinu. Není tedy vývoj penicilinové rezistence u antraxových kmenů ve všech případech pozvolný při postupném navykání pasážovaného kmene na zvyšující se dávky penicilinu. U některých kmenů dosahuje penicilinová rezistence vysokého stupně skokem.

Druhým typem penicilinové rezistence jsou kmeny, které produkují exogenní penicilinázu jen ve zcela malé míře (asi v rozsahu výchozích nerezistentních kmenů). Nízká produkce penicilinázy (2–5j) se udržuje přibližně na stejné úrovni ve všech pasážích procesu rezistence. Kmeny tohoto typu dosáhly v našem případě nižšího stupně rezistence (většinou 1280–2560j PNC/ml media) než kmeny s vysokou penicilinázovou aktivitou.

V některých případech se oba typy rezistence kombinovaly a vznikl typ smíšený. Zde obvykle po několika počátečních pasážích s nízkou produkcí penicilinázy navazoval sled pasáží s vyšší penicilinázovou aktivitou. V průběhu pasáží bylo možno někdy sledovat určitou rozkolísanost, kdy vyšší produkci penicilinázy vystřídala nižší a naopak.

V přehledu bylo dosaženo replikovou metodou u 20 antraxových kmenů těchto stupňů penicilinové rezistence:

320j PNC/ml media	2
640j PNC/ml media	3
1280j PNC/ml media	6
2560j PNC/ml media	1
5120j PNC/ml media	1
10240j PNC/ml media	2
20480j PNC/ml media	5

Všechny penicilinorezistentní kmeny rostly za normálních atmosferických podmínek v drsné formě (R-fázi).

TRVÁNÍ PENICILINOVÉ REZISTENCE

Trvání získané penicilinové rezistence *Bac. anthracis* je podmíněné. Podle všeobecného názoru, odstraníme-li antibiotikum z media, ztrácí populace relativně brzy svou rezistenci a revertuje na původně citlivou variantu.

Sledovali jsme trvání penicilinové rezistence získané replikovou metodou u našich pokusných antraxových kmenů po půlročním a jednoročním vegetačním klidu, kdy poslední stupeň dosažené rezistence byl uchován na živné půdě bez antibiotika. Po uplynutí příslušné doby byla sledována růstová schopnost na testovací půdě a penicilinázová aktivita. Uchovávané kmeny byly za toto jednoroční období přeočkovány pouze dvakrát.

Z výsledků možno konstatovat, že ze všech kmenů pouze jeden ztratil svou získanou rezistenci. Ostatní kmeny si nadále uchovaly určitý stupeň rezistence,

II. Penicilinová rezistence antraxových kmenů pasážovaných replikovou metodou

Označení kmenů	Ukazatelé	Vý- chozí kmen	Počet jednotek PNC/ml media													
			1	5	10	20	40	80	160	320	640	1280	2560	5120	10240	20480
Březnice	R	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	*
	PA	3,8	700	700	740	660	250	420	370	220	210	570	250	450	150	3,5
289	R	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	*
	PA	3,0	120	540	600	570	520	300	740	180	190	360	1300	175	900	110
AZV-41	R	***	***	*	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	***	*
	PA	5,4	3,4	570	3,4	180	400	20	165	220	1000	1400	420	100	200	130
AZV-6	R	***	***	*	*	**	***	***	***	*	*	**	*	*	—	—
	PA	2,8	3,2	3,5	160	2,8	3,4	7,2	9,2	4,2	4,4	5,0	3,8	3,2	—	—
AZV-19	R	***	***	***	***	*	***	*	***	*	*	*	*	*	*	—
	PA	3,0	3,0	3,8	3,0	21	3,5	8,4	6,8	3,4	4,2	5,0	3,8	3,0	3,6	—
4892	R	***	***	***	***	***	***	*	*	*	*	**	*	—	—	—
	PA	4,2	3,5	6,4	3,4	5,0	7,0	5,4	4,4	5,6	3,4	4,0	3,6	—	—	—
RK-194	R	***	***	***	*	*	***	*	***	*	*	—	—	—	—	—
	PA	3,4	3,4	3,4	400	5,0	37	5,0	7,4	5,0	2,4	—	—	—	—	—
17-IV-212	R	***	*	*	*	***	***	***	***	***	***	*	*	**	*	***
	PA	3,0	3,0	76	3,0	3,4	58	4,2	3,0	130	5,4	7,4	145	220	10,5	52
150	R	***	***	***	***	***	*	*	*	*	—	—	—	—	—	—
	PA	3,0	3,5	4,8	3,5	2,8	4,0	130	3,4	5,0	—	—	—	—	—	—
5/58	R	***	***	*	***	*	*	*	*	*	**	*	—	—	—	—
	PA	3,4	3,4	66	3,5	3,2	3,6	220	2,8	3,0	2,7	2,4	—	—	—	—
107	R	***	***	*	***	**	**	*	*	**	*	*	—	—	—	—
	PA	3,0	3,8	4,7	3,0	3,4	3,2	3,5	3,6	3,0	2,7	2,4	—	—	—	—

103	R	***	*	*	*	*	*	*	*	**	*	—	—	—	—	—
	PA	3,0	3,4	4,7	8,4	3,2	3,5	3,8	5,4	3,0	2,8	—	—	—	—	—
1/56	R	***	*	*	*	*	**	***	***	***	*	*	—	—	—	—
	PA	2,4	2,8	7,4	3,2	2,8	3,5	3,6	3,0	3,0	2,4	2,4	—	—	—	—
726/1	R	***	*	*	***	***	*	*	*	***	***	***	***	***	***	**
	PA	4,7	4,8	4,8	2,6	100	4,0	4,2	3,4	2,4	10	6,0	3,2	80	52	100
835	R	***	*	*	*	*	***	*	***	*	*	*	—	—	—	—
	PA	3,0	3,4	4,8	2,7	34	3,6	3,0	2,7	3,0	2,4	3,6	—	—	—	—
3308	R	***	*	*	***	***	***	***	***	***	***	***	***	*	*	—
	PA	4,2	5,4	8,4	2,8	5,0	175	145	58	29	60	44	60	52	60	—
Trutnov	R	***	*	*	*	*	*	*	*	*	*	*	—	—	—	—
	PA	2,8	3,2	3,8	2,8	4,7	3,0	4,0	2,7	3,0	2,8	2,7	—	—	—	—
86/5	R	***	***	*	*	*	*	***	***	***	*	—	—	—	—	—
	PA	3,0	3,2	4,8	4,6	4,8	3,2	4,0	4,0	3,4	2,7	—	—	—	—	—
460/55	R	***	***	*	*	*	*	***	***	***	*	*	—	—	—	—
	PA	2,8	3,2	5,0	3,0	2,8	3,4	3,6	4,8	2,4	3,2	2,8	—	—	—	—
1549	R	***	*	*	*	*	*	**	***	*	*	—	—	—	—	—
	PA	14,5	7,4	7,6	2,8	2,8	4,5	3,6	3,0	2,8	3,4	—	—	—	—	—

Legenda: R = růst (*** silný, ** slabý, * ojedinělé kolonie do 6, — úplná inhibice)

PA = penicilinázová aktivita

prevážně však značně snižený. Dále jsme mohli pozorovat, že s výjimkou jednoho případu, všechny rezistentní kmeny, které se vyznačovaly původně vysokou penicilinázovou aktivitou, tuto schopnost ztratily a produkovaly jen malé množství penicilinázy.

DISKUSE

Hodnotíme-li výsledky na úseku experimentálně dosažené penicilinové rezistence antraxových kmenů, pak je třeba přiznat, že při téže kvalitě testovací půdy byly výsledky, dosažené replikovou metodou ve srovnání s metodou definovaného inokula výrazně lepší. Nedovedeme si však vysvětlit, proč posledně jmenovanou metodou bylo dosaženo rezistence jen u dvou testovaných kmenů.

V podstatě lze rozpoznat u našich pokusných antraxových kmenů dva odlišné způsoby vytváření penicilinové rezistence. První typ je možno označit za penicilinázový. Kmeny tohoto typu produkují hned od prvních pasází relativně velké množství exogenní penicilinázy a tuto aktivitu si udržují zpravidla po celou dobu procesu vytváření rezistence. Produkce penicilinázy nestoupá postupně od pasáže k pasáži, nýbrž udržuje se stále s mírným kolísáním na poměrně vysoké úrovni. Růst těchto kmenů na testovací půdě je bohatý. Stupeň rezistence je zde vysoký. V našich pokusech bylo dosaženo až 20480j PNC/ml media. Podstata rezistence tohoto typu záleží ve vytváření inhibitoru antibiotika snad na biochemické úrovni (exogenní penicilináza).

Druhý typ naopak se vyznačoval malou penicilinázovou aktivitou. Produkce penicilinázy těchto kmenů zůstávala po celou dobu rozvíjení procesu rezistence velmi nízká a zpravidla u žádné pasáže nepřesáhla hodnotu výchozího kmene. Stupeň dosažené rezistence byl v našich pokusech o něco nižší než u prvního typu. Růst těchto kmenů nebyl zdaleka tak masivní, zejména v prvních pasážích. V dalších pasážích se růst rezistentní varianty na testovací půdě postupně značně zlepšil. Tento typ rezistence je možno považovat za vnitřní (intrinsic resistance) založený pravděpodobně na aktivitě endogenně produkované penicilinázy podle Jacob-Monodovy teorie o geneticky řízené proteosyntéze.

Třetí formou je rezistence typu smíšeného, který je kombinací obou typů základních. Zpravidla probíhá tento typ rezistence tak, že v několika prvních pasážích je produkce exogenní penicilinázy velmi nízká a zůstává na úrovni výchozího kmene. Pak najednou dochází k vnitřní změně, jejímž projevem je zvýšená tvorba penicilinázy. U některých kmenů je možno sledovat jakousi rozviklanost, která se projevuje tím, že se střídá pasáž o malé produkci s pasáží s velkou produkcí penicilinázy.

Dobu trvání rezistence jsme prověřovali po půlročním a jednorocním vegetačním klidu, kdy rezistentní kmeny byly udržovány na půdě bez penicilinu. Po půl roce vegetačního klidu bylo shledáno, že všechny kmény si ještě udržely jistý stupeň rezistence. U čtyř kmenů zůstala rezistence na původní výši. Po uplynutí jednorocního období vegetačního klidu ztratil jeden kmen svou rezistenci. U všech ostatních došlo k snížení rezistence, u některých velmi podstatně. Podle zjištěných hodnot exogenně produkované penicilinázy se ukázalo, že ve většině případů se změnila penicilinázová rezistence ve vnitřní formu rezistence, vyznačující se nízkou produkcí exogenní penicilinázy. Návor, že by mohlo jít o pomnožené nové mutanty rezistentního kmene, vzniklé za příznivých okolností působením media, lze jen stěží akceptovat, protože za celé jednorocní období vegetačního klidu byly rezistentní kmeny přeočkovány pouze dvakrát. Lze spíše soudit, že původně silně stimulovatelné kmeny ztratily regulačtový systém inducibility a produkovaly konstitutivně nízké hladiny penicilinázy, přičemž se asi exogenní fáze penicilinázy, pravděpodobně cestou genetickou, změnila ve fázi endogenní. Rádi bychom se ještě vrátili k závěru práce rumunských autorů Horodniceanu a Sasarmana (1961), ze kterého vyplývá, že autoři neprokázali vztah mezi produkcí penicilinázy a citlivostí antraxových kmenů k penicilinu. Podle těchto autorů vykazovaly oba ukazatelé změny nezávislé na sobě, a nelze proto různě stupně rezistence

k penicilinu vysvětlit produkci různého množství penicilinázy. Autoři uzavírají, že objevením penicilinázy se nepodařilo objasnit problém mechanismu rezistence mikrobů k penicilinu.

Naše výsledky však prokazují, v souladu s názory jiných autorů, že vztah mezi penicilinázovou aktivitou a rezistencí antraxových kmenů na penicilin existuje. Vysoká produkce exogenní penicilinázy je současně projevem i vysokého stupně rezistence. Tento vztah však neplatí pro všechny antraxové kmeny. U některých penicilinázová aktivita zůstává nízká, takže rezistence zde nemůže mít vztah k exogenně produkované penicilináze. V těchto případech se zřejmě jedná o určitou formu vnitřní rezistence, vyvolanou pravděpodobně endogenně produkovanou penicilinázou. Tato domněnka však nebyla zatím experimentálně doložena.

Došlo dne 14. 11. 1967

Technická spolupráce J. Kubeš.

Literatura

1. ABRAHAM, E. P., CHAIN, E. = „Nature“ 146, 1940 : 837.
2. EAGLE, H.: The multiple mechanisms of penicillin resistance. = „J. Bacteriol.“, 68, 1954 : 610-616.
3. HARNACH, R., FRÝBA, J., MESÁROŠ, E., PLEVA, V.: Výzkum o řízené a spontánní adaptaci *Bacillus anthracis* na penicilin, streptomycin a aureomycin. = „Sborník vědeckých prací výzk. ústav vet. lék. v Brně“, 1959 : 47-59.
4. HARNACH, R., MESÁROŠ, E., PLEVA, V.: Resistence terénních kmenů *Bac. anthracis* k penicilinu, streptomycinu a aureomycinu po spontánní a řízené adaptaci. = „Veterinární časopis“ 9, 1960 : 56-64.
5. HORODNICEANU, T., SASARMAN, A.: Recherches sur les pénicillinases bactériennes. III. Relations entre l'élaboration de la pénicillinase et la sensibilité à la pénicilline des souches de *Bac. anthracis*. = „Arch. roum. Path. exptl. Microb.“ 20, 1961 : 257-262.
6. KÖRNLEIN, M., KOCH, G.: Penicillinase-nachweis mit Procain-Penicillin. = „Arzneimittelforschung“ 4, 1954 : 130-132.
7. VÝMOLA, F., HEJZLAR, M.: Kvantitativní zkoušky citlivosti mikrobů na antibiotika. = „Čs. epidem., mikrob., imunolog.“, 13, 1964 : 112-120.

ПРОКУПЕК К. (Государственный ветеринарный институт, Национальная специальная лаборатория по борьбе с антраксом, Готвальдов, Чехословакия). Механизм возникновения резистентности к пенициллину у *Bacillus anthracis* после направленной адаптации. Вет. мед. (Прага) 13 (7) : 437-446, 1968.

Экспериментальным способом удалось достигнуть при помощи метода репликации определенной степени резистентности к пенициллину у всех 20 исследованных сибиреязвенных штаммов. В процессе таким образом вызванной резистентности проявился у бактериальных штаммов двойкий основной тип. Первый тип отличался высокой активностью пенициллиназы и бурным ростом на исследуемой питательной среде. Этот тип пенициллиназы является показателем того, что последняя принимает участие в возникновении резистентных штаммов. Второй тип, который встречался чаще, проявлялся неповышенной продукцией пенициллиназы. В первых пассажах он отличался, как правило, в значительной мере ограниченным ростом и не достигал такой степени резистентности как первый тип. Кажется, что сущность этого типа резистентности не основана на экзогенно произведенной пенициллиназе. Вероятно, дело касается состояния внутренней устойчивости в соответствии с теорией Якоб-Монода о генетическом управлении протеосинтезом. Путем комбинации обоих основных типов получился смешанный тип. Продолжительность резистентности к пенициллину является обусловленной. После однолетнего периода, когда не появился рост, потерял только один штамм свою полученную резистентность. У остальных штаммов произошло понижение резистентности на разной степени. Оказалось, что первоначальная резистентность пенициллиназы изменилась у большинства штаммов во внутреннюю форму резистентности.

Bacillus anthracis; G-пенициллин; пенициллиназа; резистентность; активность пенициллиназы; внутренний тип резистентности пенициллиназы; смешанный тип резистентности.

PROKÚPEK, K. (The State Veterinary Institute, The National Reference Laboratory for Anthrax, Gottwaldov, Czechoslovakia). *The Mechanism of the Arising of Resistance to Penicillin in Bacillus anthracis after Controlled Adaptation*. Vet. Med. (Praha) 13 (7) : 437—446, 1968.

By means of the replica method it was possible to experimentally produce a certain degree of resistance to penicillin in all 20 tested anthrax strains. In the process of the thus induced resistance there appeared a basic type of two kinds in the bacterial strains. The first type showed a high penicillinase activity with luxurious growth on the testing medium. This penicillinase type proved the fact that penicillinase participates in the arising of resistant strains. The second type, which was more frequent, showed a non-increased production of penicillinase. In the first passages it showed an as a rule considerably limited growth and did not reach the height of resistance of the first type. It seems that the substance of this type of resistance is not based on exogenically produced penicillinase. It is probably a state of internal resistance in the sense of Jacob-Monod's theory on the genetic regulation of proteosynthesis. A combination of both basic types was the mixed type. The duration of penicillinase resistance is conditional. After a one years' period of vegetative rest only one strain lost its gained resistance. In the other strains a lowering of resistance occurred at different degrees. It was shown that in a majority of the strains the original penicillinase resistance changed into an internal form of resistance.

Bacillus anthracis; C-penicillin; penicillinase; resistance; penicillinase activity; penicillinase type of resistance; mixed type of resistance.

PROKÚPEK, K. (Staatliches Veterinärinstitut, Nationales Referenzlaboratorium für Anthrax, Gottwaldov, Tschechoslowakei). *Mechanismus der Entstehung der Resistenz auf Penicillin bei Bacillus anthracis nach der gelenkten Adaptation*. Vet. Med. (Praha) 13 (7) : 437—446, 1968.

Es ist gelungen, mittels Replikmethode experimentell bei allen 20 getesteten Milzbrand-Stämmen einen gewissen Grad der Resistenz auf Penicillin zu erzielen. Im Prozeß der auf diese Weise hervorgerufenen Resistenz kam bei bakteriellen Stämmen zweifacher Grundtyp zum Vorschein. Der erste Typ hat sich durch hohe Penicillinase-Aktivität und üppigen Wuchs auf einem Prüfungsnährboden gekennzeichnet. Dieser Penicillinase-Typ war ein Beweis dafür, daß die Penicillinase an der Entstehung der Resistenzstämme teilnimmt. Der zweite Typ, der häufiger vorkam, hat eine unerhöhte Penicillinase-Produktion erwiesen. In den ersten Passagen wurde er in der Regel mit einem beträchtlich begrenzten Wuchs charakterisiert und erreichte keine so große Resistenz, wie der erste Typ. Das Wesen dieses Typs der Resistenz scheint nicht auf der exogen produzierten Penicillinase gegründet zu sein. Es handelt sich wahrscheinlich um einen Zustand der inneren Resistenz im Sinne der Jacob-Monodschen Theorie von der genetischen Regelung der Proteosynthesis. Durch Kombination beider Grundtype entstand ein gemischter Typ. Die Dauer der Penicillinase-Resistenz ist bedingt. Nach einem Jahr der Vegetationsruhe verlor nur ein Stamm seine erworbene Resistenz. Bei anderen Stämmen kam es zur Herabsetzung der Resistenz in verschiedener Stufe. Es hat sich gezeigt, daß sich die ursprünglich Penicillinase-Resistenz bei meisten Stämmen in eine innere Form der Resistenz verwandelt hat.

Bacillus anthracis; G-Penicillin; Penicillinase; Resistenz; die Penicillinase-Aktivität; der innere Typ der Resistenz; die Dauer der Penicillinase-Resistenz; der Penicillinase-Typ der Resistenz; der gemischte Typ der Resistenz.

Adresa autora:

MVDr. Kamil Prokúpek, CSc., Státní veterinární ústav, Národní referenční laboratoř pro antrax, Gottwaldov

Rukopis odevzdán k tisku 22. 4. 1968

Popsáno k tisku 7. 8. 1968

OBSAH

Kabelík V.: Testování patogenity virových kmenů Newcastleleské choroby na holubech	385
Černík K., Černíková E.: Množení viru pseudomoru drůbeže na tkáňových kulturách při různých teplotách	393
Dvořák R.: Optimální koncentrace ptačího tuberkulinu a diagnostická efektivnost tuberkulinace u slepic	403
Toman J.: Zhodnocení sérologických vyšetření na bedsoniozu plemenných býků a vztah k plodnosti	409
Konrád J., Kroupová V.: Aktivita alkalické fosfatázy v krevním séru skotu za různých fyziologických podmínek	415
Jiran E., Petr G., Urbánek Z.: K přípravě imunních globulinů proti psince a infekční hepatitidě psů	423
Škarda J., Bartoš S., Doležel F.: Vliv ACTH, STH a noradrenalinu na hladinu NEMK, glukózy a ketoláték v krvi koz	431
Prokůpek K.: Mechanismus vzniku rezistence na penicilin u <i>Bacillus anthracis</i> po řízené adaptaci	437

СОДЕРЖАНИЕ

Кабелик В.: Исследование патогенности вирусных штаммов ньюкастльской болезни на голубях	391
Черник К., Черникова Е.: Размножение вируса псевдочумы птиц на тканевых культурах при различных температурах	401
Дворжак Р.: Оптимальная концентрация птичьего туберкулина и диагностическая эффективность туберкулинации у кур	407
Томан Й.: Оценка серологических исследований на бедсонииоз племенных быков и отношение к плодovitosti	414
Конрад Й., Кроупова В.: Активность щелочной фосфатазы в кровяной сыворотке крупного рогатого скота в разных физиологических условиях	421
Йиран Е., Петр Г., Урбанек З.: Подготовка имунных глобулинов против чумы собак и инфекционного гепатита собак	430
Шкарда Й., Бартош С., Долежел Ф.: Влияние ACTH, STH и норадrenalina на уровень неэтерифицированных жирных кислот, глюкозы и кетонových веществ в крови коз	435
Прокупек К.: Механизм возникновения резистентности к пенициллину у <i>Bacillus anthracis</i> после направленной адаптации	445

CONTENT

Kabelík V.: Testing of the Pathogenicity of Virus Strains of the Newcastle Disease in Pigeons	391
Cerník K., Černíková E.: Propagation of the Newcastle Disease Virus on Tissue cultures at Different Temperatures	402
Dvořák R.: Optimum Concentration of Avian Tuberculin and the Diagnostic Effectiveness of Tuberculinization in Hens	407
Toman J.: Evaluation of Serological Examinations of Breeding Bulls for Bedsoniosis and its Relation to Fertility	414
Konrád J., Kroupová V.: The Activity of Alkaline Phosphatase in the Blood Serum of Cattle under Different Physiological Conditions	421
Jiran E., Petr G., Urbánek Z.: On the Preparation of Immune Globulins against Distemper and Infectious Hepatitis of Dogs	430
Škarda J., Bartoš S., Doležel F.: The Influence of ACTH, STH, and of Noradrenalin on the Level of NEFA, Glucose, and Keto-Substances in the Blood of Goats	436
Prokůpek K.: The Mechanism of the Arising of Resistance to Penicillin in <i>Bacillus anthracis</i> after Controlled Adaptation	446

INHALT

Kabelík V.: Testung der Pathogenität der Virusstämme der Newcastle-Krankheit an Tauben	392
--	-----

Černík K., Černíková E.: Die Vermehrung des Virus der Pseudo-geflügelpest auf Gewebekulturen bei verschiedenen Temperaturen	402
Dvořák R.: Die optimale Konzentration des aviären Tuberkulins und die diagnostische Effektivität der Tuberkulinisierung bei Hennen	408
Toman J.: Die Bewertung der serologischen Untersuchungen auf Bedsoniose der Zuchtbullen und die Beziehung zur Fruchtbarkeit	414
Konrád J., Kroupová V.: Die Aktivität der alkalischen Phosphatase im Blutserum des Rindes unter verschiedener physiologischer Bedingungen	421
Jiran E., Petr G., Urbánek Z.: Zur Herstellung der immunen Globuline gegen Hundestaupe und infektiöse Hepatitis der Hunde	430
Škarda J., Bartoš S., Doležel F.: Einfluß des ACTH, STH und Noradrenalins auf den Gehalt des Ziegenblutes an nichtesterifizierten Fettsäuren (NEFS), Glukose und Ketonstoffen	436
Prokůpek K.: Mechanismus der Entstehung der Resistenz auf Penicillin bei <i>Bacillus anthracis</i> nach der gelenkten Adaptation	446

TABLE DES MATIÈRES

Kabelík V.: Testage de la pathogénésité des souches de virus de la maladie de Newcastle, effectuée sur les pigeons (res. An/391, Al/392).	
Černík K., Černíková E.: Reproduction du virus de la pseudo- peste (maladie de Newcastle) de la volaille dans les cultures de tissus à des températures différentes (res. An, Al/402).	
Dvořák R.: Concentration optimum des tuberculines aviaires et efficacité diagnostique de la tuberculinisation chez les poules (res. An/407, Al/408).	
Toman J.: Appréciation des explorations sérologiques portant sur la bedsoniose des taureaux reproducteurs et le rapport à la fécondité (res. An, Al/414).	
Konrád J., Kroupová V.: Activité de la phosphatase alcaline dans le sérum sanguin des bovins dans les conditions physiologiques différentes (res. An, Al/421).	
Jiran E., Petr G., Urbánek Z.: Préparation des globulines immunisantes pour la lutte contre le mal de chien et contre l'hépatite infectieuse des chiens (res. An, Al/430).	
Škarda J., Bartoš S., Doležel F.: Influence de ACTH, de STH et de noradréline sur le niveau de NEAG, de glucose et de matières cétoniques dans le sang des chèvres (res. An, Al/436).	
Prokůpek K.: Mécanisme de la naissance de la résistance de <i>Bacillus anthracis</i> à la pénicilline, à la suite de l'adaptation réglée (res. An, Al/446).	